

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le Titre de DOCTEUR 3ème cycle

SPECIALITE: DEVELOPPEMENT ET AMELIORATION DES VEGETAUX

PAR

M. BAKRY Frédéric

SUJET: APPLICATION DES TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO POUR
L'AMELIORATION DU BANANIER (MUSA SP.).

soutenue le 11 décembre 1984 devant la Commission d'examen

MM. DEMARLY Président

CHEVAUGEON

GANRY

Mme ROSSIGNOL Rapporteur

RESUME.

Ce travail présente comment, une partie des techniques de culture in vitro, est susceptible d'être utilisée pour l'amélioration du bananier (Musa sp.).

Dans le cadre d'une multiplication végétative accélérée à partir d'apex végétatifs, les nouvelles plantes sont issues de la réorganisation des méristèmes caulinaires qui ont été coupés puis de leur fasciation et aussi de la néoformation directe de bourgeons sur la tige. Des pousses végétatives ont pu être aussi obtenues directement, à partir d'inflorescences.

Des cals, issus de tissus d'origine très différente (végétatifs et floraux) ont été initiés mais seuls, ceux provenant d'explants inflorescentiels ont montré une organogénèse caulinaire et permettent l'isolement de protoplastes.

Les observations morphologiques ont été couplées à des études cytologiques et les conséquences sur la conformité ou non de la technique de multiplication employée sont discutées.

MOTS CLES : Musa sp., multiplication conforme, culture de tissus, néoformation caulinaire, protoplastes, amélioration des plantes.

SUMMARY:

This work brings up how certain in vitro culture techniques are open to be used for banana tree (Musa sp.) breeding.

As part of accelerated vegetative multiplication from vegetative apex, new plants stem from the reorganization and the fasciation of cut shoot meristem and also from the straight neoformation of buds on the shoots. It was also possible to obtain vegetative shoots from inflorescences.

Callus have been initiated from different type of tissues (vegetative and floral parts) but only the ones coming from inflorescence fragments have shown a shoot organogenesis and allow protoplasts isolation.

The conformity of the techniques of multiplication is discussed in regards to the morphological observations completed by cytological studies.

- REMERCIEMENTS -

Ce travail a été exécuté dans le laboratoire de Morphogenèse végétale et expérimentale de la Faculté d'ORSAY - PARIS XI.

Nous tenons d'ores et déjà à signaler, que les travaux initiaux qui ont trait à la mise en culture de tous les tissus floraux et inflorescentiels de bananiers, et les premières analyses du comportement de tous ces explants en culture in vitro, ont été faits par Madame GUIGNARD-LAVARDE Françoise dans le cadre de son stage pratique de DEA de développement et amélioration des végétaux, mené dans notre laboratoire. Les comptages chromosomiques, faits sur les plantes issues de ce même matériel, ont été réalisés par Monsieur HORRY Jean-Pierre et ce, pour la même occasion.

Qu'ils en soient, ici, tous deux, remerciés et assurés de ma sincère reconnaissance.

Que Monsieur DEMARLY, qui a accepté de me confier la responsabilité de ces travaux en relation avec l'Institut de Recherche des Fruits et Agrumes (IRFA), ainsi que Madame ROSSIGNOL et Monsieur HAICOUR qui ont toujours su être disponibles aussi souvent que cela s'avèrait nécessaire, soient remerciés pour leur encadrement scientifique et les conseils judicieux et précieux qu'ils m'ont donné tout au long de ces travaux. Qu'ils trouvent ici, l'expression de ma profonde gratitude.

Nous exprimons nos sincères remerciements à Monsieur CHEVAUGEON qui a bien voulu, malgré ses multiples tâches, examiner ce travail.

Nous voudrions également remercier l'IRFA, et plus particulièrement Messieurs CHAMPION et GANRY, initiateurs du programme d'amélioration génétique du bananier, pour tous les moyens qu'ils ont mis à notre disposition, pour mener à bien nos travaux, aussi aisément que possible, ainsi que M.TEISSON pour les idées qui ont pu naître au cours de nos discussions.

Nous sommes reconnaissants à Madame DEFOUG de nous avoir aidé pour la réalisation des dessins, à Monsieur FROGER pour le tirage des photos et Madame PORTIGLIAITI pour la dactylographie de ce manuscrit.

Enfin, que tous les membres, chercheurs et techniciens, des laboratoires de morphogenèse végétale et expérimentale et d'amélioration des végétaux de la Faculté d'ORSAY - PARIS XI, soient remerciés pour leur aide technique et pratique qu'ils nous ont apporté tout au long de ce travail.

- S O M M A I R E -

I - INTRODUCTION.....	1
A. Présentation de la plante	1
1) Origine et dispersion des bananiers	1
2) Production et commerce international	3
3) Description morphologique du bananier	5
4) Les produits tirés du bananier	8
5) Evolution et biologie du bananier	9
5-1 : Systématique et évolution	9
5-2 : Biologie et agents pathogènes	12
B. Amélioration du bananier	13
1) Amélioration génétique	13
2) Utilisation des techniques de culture <u>in vitro</u> pour	
1'amélioration du bananier	17
2-1 : Historique des travaux déjà réalisés en culture <u>in vitro</u> .	17
2-2 : Cadre de nos recherches	19
II - MATERIEL et METHODES.....	22
A. Matériel végétal	22
1) Matériel prélevé <u>in situ</u>	22
2) Jeunes plantes cultivées <u>in vitro</u>	23
B. Méthodes	23
1) Composition des milieux de culture et des solutions	
enzymatiques	23
1-1 : Milieux de culture	23
1-2 : Solutions enzymatiques	25
2) Stérilisation et conditions de mise en culture des explants ...	26
2-1 : Méthode de stérilisation	26
2-2 : Conditions des pièces de culture	27
3) Mise en culture d'explants pourvus de régions méristématiques	
préexistantes	27
3-1 : Mise en culture de fragments de sommets de rejets	27
3-2 : Mise en culture de bourgeons inflorescentiels	27
4) Mise en culture d'explants ne possédant pas, à priori,	
de régions méristématiques	28
4-1 : Composition des milieux et conditions de culture	28
4-2 : Nature du matériel végétal	29

5) Techniques utilisées	30
5-1 : Technique d'isolement de protoplastes	30
5-2 : Techniques cytologiques	30
5-2-1 : Fixation	30
5-2-2 : Observations histologiques	30
5-2-3 : Technique de comptage chromosomique par écrasement	31
5-3 : Méthode statistique	32
III - <u>RESULTATS</u>	33
A. Stérilisation des explants primaires	33
1) Stérilisation du matériel végétatif	33
2) Stérilisation du matériel reproducteur	33
3) Conclusions	35
B. Multiplication végétative conforme <u>in vitro</u>	37
1) A partir de méristèmes végétatifs	37
1-1 : Mise en culture de sommets de rejets prélevés <u>in vivo</u> ..	37
1-1-1 : Apparition des pousses végétatives	37
1-1-2 : Entretien <u>in vitro</u> d'un stock initial de plantes ..	38
1-2 : Multiplication végétative de bananiers déjà cultivés <u>in vitro</u>	40
1-2-1 : Effets de l'incision verticale de la tige, et du milieu de culture	40
1-2-2 : Etude histologique de l'ontogenèse des plantes produites	43
1-3 : Conclusions et discussion	44
1-3-1 : Les principales étapes de l'ontogenèse des nouvelles plantes, produites lors de la multiplication végétative de bananiers déjà cultivés <u>in vitro</u>	44
1-3-2 : Comparaison des résultats obtenus lors de la multi- plication végétative en fonction de l'origine du matériel (<u>in vivo</u> ou <u>in vitro</u>)	46
1-3-3 : Conditions permettant l'apparition et le développement de nouvelles pousses	48
1-3-4 : Quelques informations concernant la conformité et l'homogénéité des nouvelles pousses obtenues	49
1-3-5 : Proposition d'une méthode de multiplication végétative accélérée et conforme du bananier <u>in vitro</u>	51
2) A partir d'apex inflorescentiels	53
2-1 : Apparition de pousses feuillées	53
2-1-1 : Expérience préliminaire	55
2-1-1-1 : Réactions des explants primaires	55
2-1-1-2 : Réactions des explants au cours des repiquages ...	57
2-1-2 : Répétition de l'expérience	59
2-2 : Morphologie des pousses feuillées	60
2-3 : Conclusions et discussion	61
2-3-1 : Influence des régulateurs de croissance sur la formation et l'intensité d'obtention de pousses feuillées	62
2-3-2 : Lieu d'initiation et morphologie des pousses feuillées	63
2-3-3 : Ces pousses feuillées répondent-elles à une multi- plication végétative conforme ?	64

C. Analyse des processus conduisant à un élargissement de la variabilité en culture <u>in vitro</u>	68
1) Etude de la callogénèse à partir d'explants prélevés sur des plantes cultivées <u>in vitro</u>	68
1-1 : Callogénèse à partir de fragments de racine	68
1-2 : Callogénèse à partir de fragments de feuilles	68
1-2-1 : Essais préliminaires : études de facteurs favorisant le phénomène	68
1-2-1-1 : Influence de la lumière	69
1-2-1-2 : Influence de l'adjonction de régulateurs de croissance	70
1-2-1-3 : Influence de l'explant	73
1-2-1-4 : Conclusions	73
1-2-1-4-1 : Problèmes posés par le noircissement des tissus et des milieux	74
1-2-1-4-2 : Action différente des régulateurs de croissance selon leur nature,	75
1-2-2 : Etude de la callogénèse obtenue avec des milieux contenant du 2,4 D et du 2,4,5 T	76
1-2-2-1 : Influence de paramètres liés à l'initiation et la croissance du cal	77
1-2-2-1-1 : Positionnement de l'explant sur le milieu	77
1-2-2-1-2 : Influence de la zone de prélèvement de l'explant dans la feuille	77
1-2-2-1-3 : Importance de l'état physiologique de la feuille,	79
1-2-2-1-4 : Modification des composantes du milieu .	79
1-2-2-2 : Etude histologique de l'initiation de la callogénèse,	80
1-2-2-2-1 : Anatomie de la feuille lors de la mise en culture,	81
1-2-2-2-2 : Initiation et développement du cal	83
1-2-2-3 : Entretien des cultures et essais d'induction de la callogénèse,	85
1-2-2-3-1 : Entretien des cultures et importance de l'état sanitaire des plantes,	85
1-2-2-3-2 : Essais de traitements visant à favoriser la callogénèse,	86
1-2-2-4 : Conclusions et discussion	88
1-2-2-4-1 : Importance de la position et du choix de l'explant pour l'initiation de la callogénèse	88
1-2-2-4-2 : Etude de la callogénèse	90
1-2-2-4-3 : Essais de traitements callogènes	94
1-2-2-4-4 : En conclusion	95

2) Callogenèse et organogenèse à partir des tissus floraux et inflorescentiels	97
2-1 : Tests préliminaires : mise en culture de divers tissus floraux et inflorescentiels	98
2-1-1 : Cultures initiales : influence du milieu de culture et du matériel végétal utilisés	98
2-1-2 : Repiquage des cals et essais de traitements susceptibles de provoquer des néoformations caulinaires..	101
2-2 : Développement de cals à partir d'explants inflorescentiels plus complexes	102
2-2-1 : Initiation des cals	102
2-2-2 : Croissance des cals	103
2-2-3 : Description des différentes modalités d'organogenèse observées sur ces cals	105
2-3 : Conclusionset discussion	107
2-3-1 : Initiation des cals à partir des tissus floraux et inflorescentiels simples (tests préliminaires)	107
2-3-2 : Callogenèse à partir d'explants inflorescentiels plus complexes	110
2-3-2-1 : Conditions et lieux d'apparition des cals	110
2-3-2-2 : Analyse de la structure et de l'organogenèse des cals	111
3) Isolement et mise en culture de cellules isolées et de protoplastes	114
3-1 : Essais effectués à partir de divers matériels végétaux ..	114
3-2 : Conclusions	115
D. Conclusions générales	117
1) Objectif du travail	117
2) Les données acquises	118
3) Limites	120
4) Perspectives	121
BIBLIOGRAPHIE	123

I - INTRODUCTION.

A. Présentation de la plante.

Le bananier (Musa sp.), monocotylédone de la famille des Musacées, est, dans les régions de la zone intertropicale du monde, d'une importance alimentaire et économique primordiale.

La banane est un aliment de base et fait partie des cultures vivrières dans beaucoup de pays en voie de développement (4/5ème de la production totale mondiale); elle est aussi cultivée à grande échelle, et devient également un bien d'exportation pour un grand nombre de ces pays, représentant ainsi un atout économique certain.

En Afrique, la consommation bananière se place au 4ème rang dans la ration alimentaire quotidienne (100kg/personne/an). La banane est une baie riche en sucres (amidon, saccharose), en vitamines (A_1 , B_1 , B_2 et C) et en sels minéraux (potassium, magnésium, sodium et phosphore), mais sa très faible teneur en protéines surtout et son absence de lipides ne lui permettent pas d'intervenir seule dans l'alimentation.

1°) Origine et dispersion des bananiers (Fig.1).

La culture bananière est certainement très ancienne. Le bananier semble avoir été domestiqué très précocement par l'homme dès le début de la sédentarisation, plus particulièrement dans le Sud-Est asiatique, centre d'origine et de dispersion. Comme nous pouvons le constater sur la figure n°1, la répartition des bananiers à travers le monde qui suit les migrations humaines est très complexe. Nous allons essayer d'en tirer les caractéristiques essentielles.

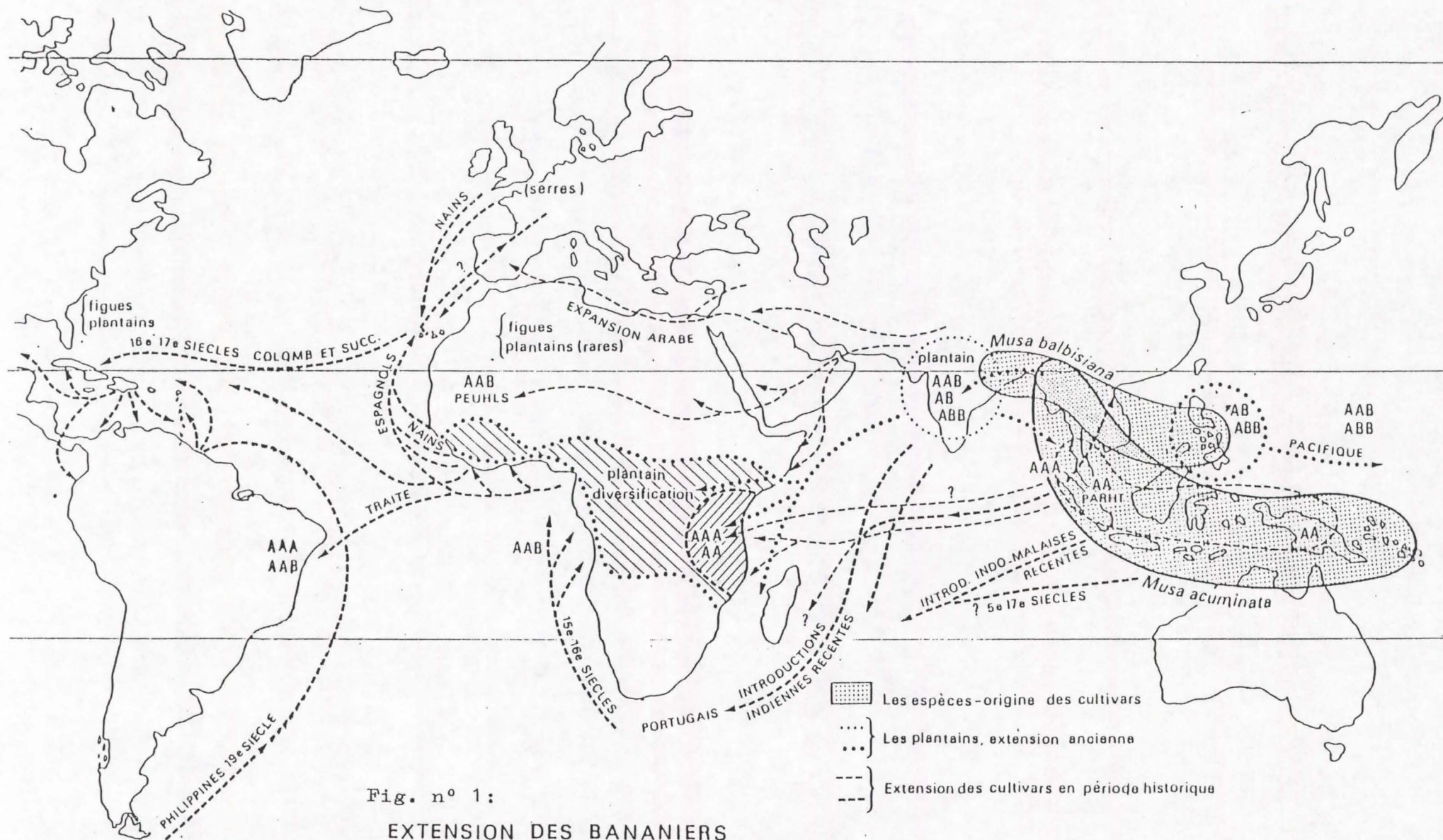


Fig. n° 1:

EXTENSION DES BANANIERES
(d'après CHAMPION , 1967)

Un document datant de 350 ans A.J.C, suggère l'existence de bananiers 2.000 ans plus tôt. Ceux-ci sont décrits comme portant des " fruits gros comme des cornes ", il s'agit probablement d' "Horn plantains". A partir de l'aire d'origine, il semble que les bananiers se soient répandus, par la Malaisie, jusqu'à la bordure Ouest du Pacifique.

Ils n'atteignent le bassin méditerranéen qu'avec les conquêtes de Mohamed en 650. Transportés par les marchands arabes, ils arrivent sur la Côte Est de l'Afrique au milieu du premier millénaire de notre ère, puis se sont répandus à travers tout le Nord de ce continent jusqu'à la Côte Ouest. On retrouve des traces de certains bananiers à partir de 1300 au MOMBASA (TANGANYIKA), au MOZAMBIQUE en 1543. Ceci n'est qu'une hypothèse car la grande variabilité des formes trouvées en OUGANDA, la grande complexité des usages et les relations étroites entre les sociétés et la plante suggèrent, en Afrique, une introduction bien antérieure des bananiers à celle qui a été proposée.

Les portugais amenèrent aux Iles Canaries, les premiers cultivars en 1402. Les bananiers atteignèrent le continent américain en 1516, vraisemblablement les clones " Silkfig " et " French Plantain ". "Gros Michel " ainsi que "Cavendish nain " ne furent introduits que beaucoup plus tardivement, au 19ème siècle.

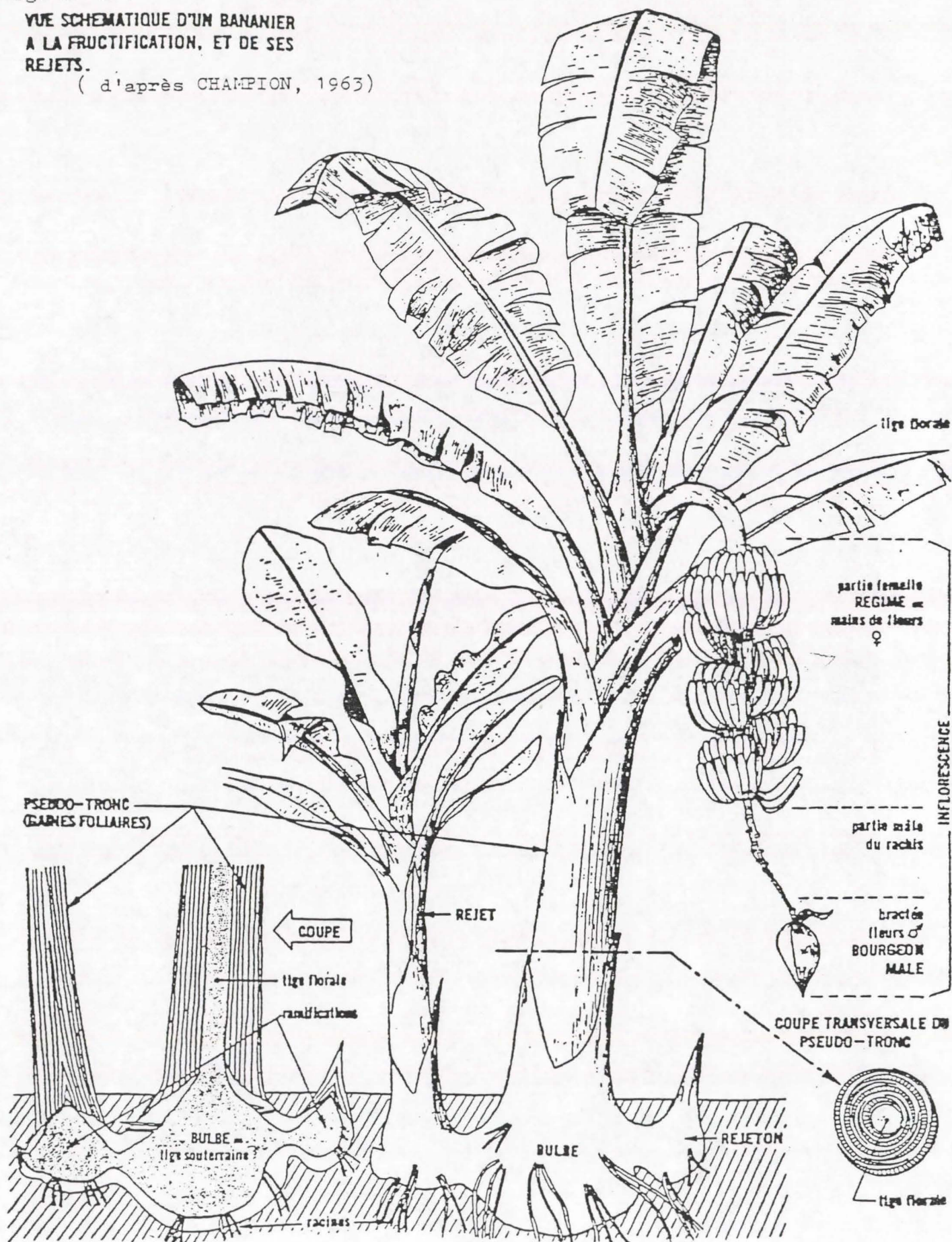
2°) Production et commerce international.

Dès les années 1870 ont eu lieu les premiers frets réguliers de bananiers. La culture bananière prend alors son plein essor avec la mise en place d'une culture intensive. Les productions en provenance des Caraïbes, d'Amérique centrale, du Nord Ouest de l'Amérique du Sud et du Brésil sont destinées exclusivement aux marchés de l'Amérique du Nord. Une grande partie de l'histoire socio-économique des pays d'Amérique centrale est liée à l'exploitation de cette plante.

Fig. n° 2 :

VUE SCHEMATIQUE D'UN BANANIER
A LA FRUCTIFICATION, ET DE SES
REJETS.

(d'après CHAMPION, 1963)



Actuellement, ce sont approximativement 60 millions de tonnes qui sont obtenues annuellement. Les productions réservées à l'exploitation représentent un commerce qui, bien qu'il ait tendance à stagner ces dernières années, reste important. Les échanges entre pays producteurs (souvent en voie de développement) et pays consommateurs (plus riches) sont très compliqués et régis par des accords très stricts.

En France, ces dernières années, 460.000 tonnes de bananes sont consommées annuellement, dont les deux tiers provenant des Antilles (Martinique et Guadeloupe). Dans ces îles, la culture bananière est l'un des piliers de l'activité économique. En Guadeloupe, par exemple, la production est de 140.000 tonnes/an, à destination exclusive de la métropole. Avec 7.200 hectares de bananeraies, cette production fait vivre 1.500 planteurs, procure, en 1982, un revenu régulier de 100 millions de francs, représentant environ 50 % de la balance commerciale d'exportation de l'île. Le tiers restant des importations françaises provient des pays d'Afrique noire (Côte d'Ivoire, Cameroun et Madagascar) et pour une moindre part, des pays d'Amérique centrale.

3°) Description morphologique du bananier (fig.2)

Les bananiers, dans leur phase végétative, sont de grandes herbes perennes comportant une tige souterraine, pourvue d'un système racinaire adventif et d'un pseudo-tronc terminé par une couronne de feuilles (Fig.2). La tige souterraine, à croissance sympodiale, est un corme de 30 cm de diamètre en moyenne.

Les bourgeons latéraux sont situés au niveau de celui-ci et occupent une position tout à fait particulière. On trouve en effet un bourgeon axillaire à l'opposé de l'insertion de la gaine foliaire au lieu d'être à son aisselle ce qui, du point de vue morphogénétique, soulève de nombreuses controverses. Un certain nombre de ces bourgeons évoluent en rejets; ces

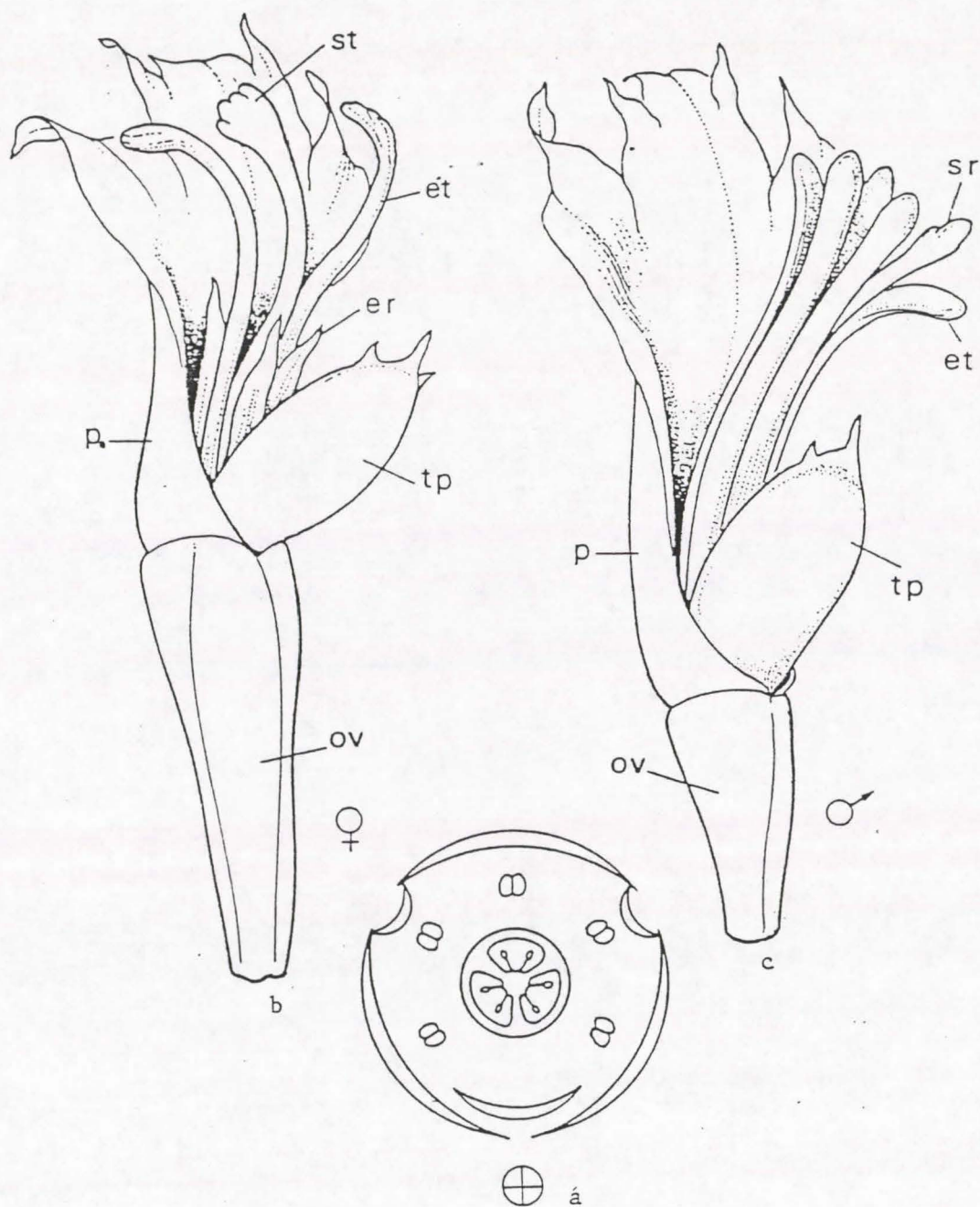


Fig. n° 3: Fleurs de bananier. a:diagramme floral. b:fleur "femelle" de bananier. (st: stigate; sr: stigate réduit; et: étamine normale; er: étamine réduite; tp: tépale libre; p: périgone; ov: ovaire). c:fleur "mâle" de bananier.

derniers sont bloqués dans leur développement tant qu'ils restent attachés à la plante dont ils sont issus, leurs feuilles ayant alors une forme d'éperon.

Les racines, au nombre de 300 environ, prennent naissance au niveau du péricycle. Elles pénètrent difficilement dans les sols durs et ont tendance à rester dans les horizons superficiels.

La partie aérienne est faite d'un pseudo-tronc ou stipe, constitué par l'accolement des gaines foliaires, d'où émergent les feuilles proprement dites, complètement étalées à maturité. La phyllotaxie est spirodistique et l'angle de divergence est de 176° . Les feuilles comprennent 3 parties : gaine, pétiole et limbe.

Le bananier est, en outre, l'herbe la plus gigantesque connue puisque sa hauteur peut varier de 2 à 15 m et que les limbes de ses feuilles atteignent en général 1 à 5 m de long. Sa stature, associée à l'absence de tige aérienne véritable, ainsi que ses racines pénétrant peu profondément dans le sol, font que le bananier est une plante fragile, très sensible aux vents qui peuvent le déraciner ou bien casser le pseudotrac.

Le passage de l'état végétatif à l'état floral peut être décelé précocement par une modification du méristème terminal qui s'allonge, puis ébauche des structures inflorescentielles. Dans un deuxième temps, à l'intérieur du stipe, se développe un long pédoncule, à élongation rapide (8cm/jour chez la variété "Lacatan"), qui porte l'inflorescence à l'air libre, hors de la couronne foliaire (Fig.2).

L'inflorescence est un épi de cymes unipares scorpioïdes : l'axe inflorescentiel porte des bractées à l'aisselle desquelles, les fleurs sont, en général, insérées sur deux rangs. L'ensemble d'une bractée et des fleurs correspondantes forme ce que l'on appelle communément une " main ", chaque fleur représentant alors un " doigt ".

transformation agro-alimentaire pour être sèchées, produire de l'alcool, être transformées en farine ou bien en pâte entrant dans la composition d'autres produits alimentaires.

Aux Philippines, des fibres textiles sont tirées de la gaine foliaire d'une espèce particulière " Abaca " (M. textilis Née x = 10), et servent à la fabrication des cordages.

Il est à noter que c'est dans le Sud Est asiatique, centre d'origine et de diversification des bananiers, que les utilisations faites des différentes parties de la plante sont les plus variées : consommation des bourgeons floraux terminaux en salade, utilisation des feuilles pour la couverture des cases et l'emballage de produits frais, nourriture pour les animaux, etc

5°) Evolution et biologie du bananier.

5-1 : Systématique et évolution.

La famille des Musacées fait partie de l'ordre des Scitaminales et comprend deux genres, Ensete et Musa. La différence la plus marquante entre ces deux unités est que les plantes du genre Ensete, à l'inverse de celles du genre Musa, ne forment jamais de rejets. Le genre Musa, compte 30 à 40 espèces sauvages, diploïdes, séminifères. non parthénocarpiques. Elles sont regroupées principalement en quatre sections : Callimusa et Australimusa (x = 10), Rhodochlamys et Eumusa (x = 11) (Fig.4). C'est dans cette dernière section, relativement ancienne et contenant une douzaine d'espèces que l'on trouve les 2 espèces de bananiers qui sont à l'origine de tous les cultivars exploités pour leurs fruits, M. acuminata Colla et M. balbisiana Colla.

L'évolution vers les cultivars actuels s'est faite en plusieurs étapes (Fig.5).

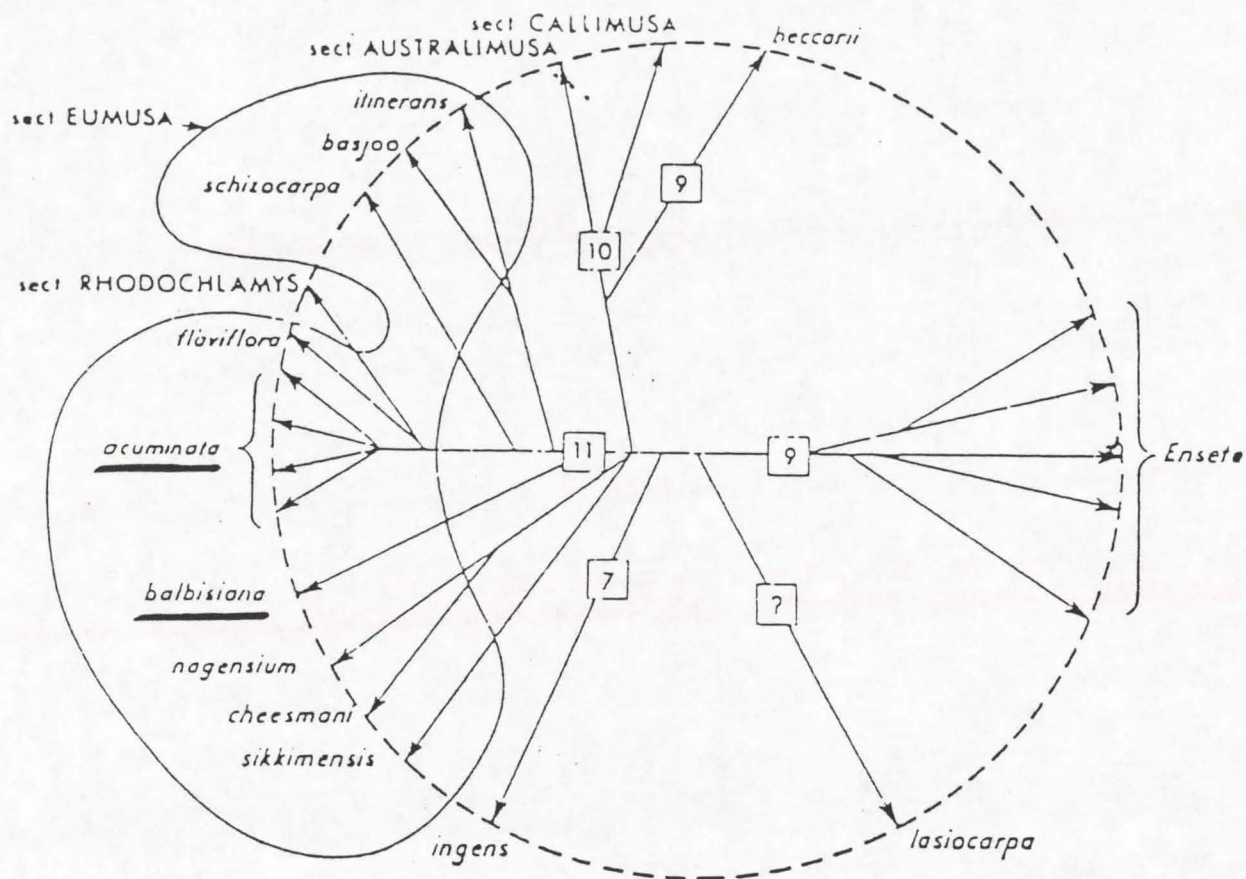


Fig. n° 4: Evolution des bananiers sauvages.
(d'après SIMMONDS, 1962)

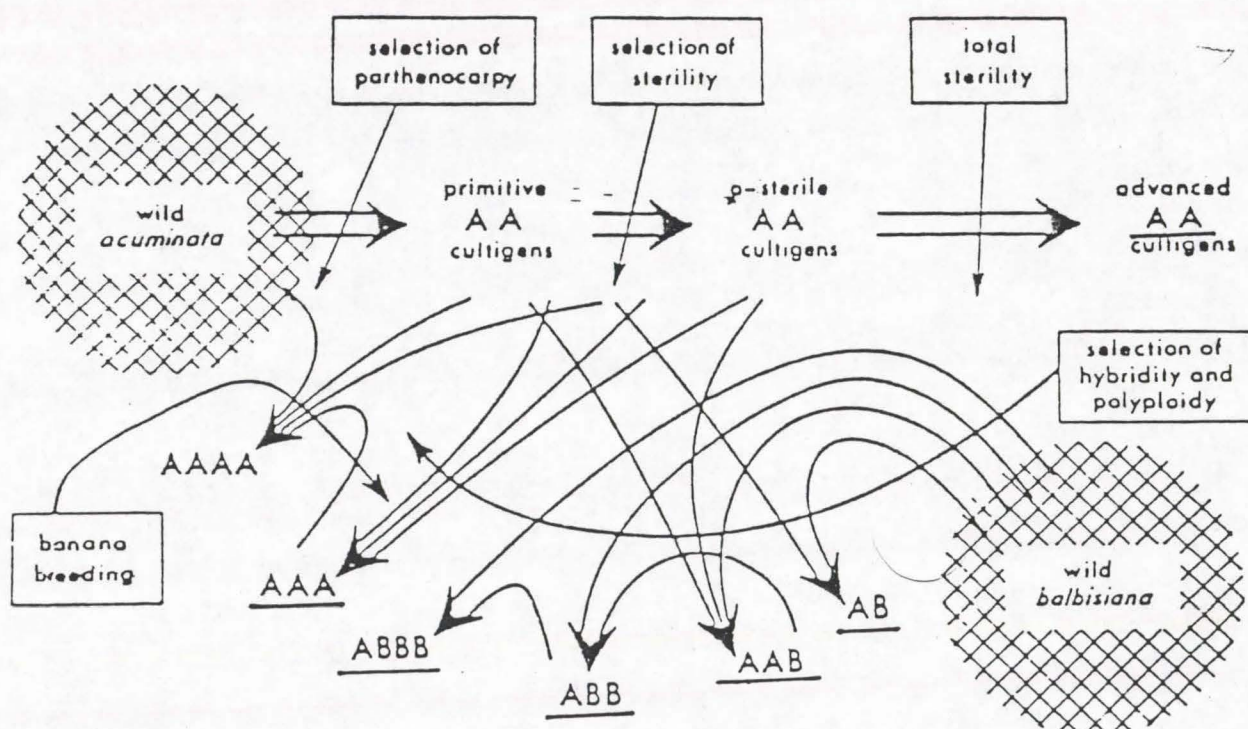


Fig. n° 5 : Evolution, dans la section Eumusa, des bananiers sauvages vers les bananiers cultivés.
(d'après SIMMONDS, 1962)

La sélection par l'homme, dans un premier temps, a mené à l'obtention, à partir de M. acuminata, de cultivars diploïdes, parthénocarpiques, et relativement stériles dont l'un des représentants actuels est le cultivar Sucrier (AA).

Dans un second temps, de ces diploïdes AA, suite à une restitution chromosomique lors de la méiose, des bananiers triploïdes AAA sont apparus. Les hybrides ont très certainement retenu toute l'attention des hommes attendu que le niveau triploïde représente un gain de vigueur et de rentabilité.

Une étape importante de diversification a été franchie avec la pollinisation d'un cultivar diploïde AA (peut-être triploïde AAA) par du pollen de l'espèce sauvage M. balbisiana (BB), pour donner une descendance triploïde AAB. M. balbisiana est une plante plus résistante à certains agents pathogènes et permet une adaptation à certains climats locaux (SIMMONDS, 1962). Suite à cette hybridation interspécifique, la base génétique relativement étroite des bananiers diploïdes AA a été élargie et a permis, par exemple, une expansion géographique des bananiers.

Actuellement, plus de 3.000 cultivars ont été recensés, répartis en six groupes, d'inégale importance : AA, AAA, AB, AAB, ABB, ABBB (Fig. 5). Ils sont tous stériles et parthénocarpiques. Toutefois il est à noter que l'on ne trouve pas de cultivar diploïde, M. balbisiana (BB).

La stérilité a une origine mal définie. Elle serait due à des causes très diverses dont l'une des plus importantes est le niveau de ploïdie : la triploïdie entraînant le mauvais appariement des chromosomes à la méiose. On connaît néanmoins des bananiers diploïdes stériles. La parthénocarpie, constamment recherchée par l'homme est totale chez les bananiers cultivés; elle est indépendante génétiquement de la stérilité. Ces deux caractères ont été constamment co-sélectionnés par l'homme.

Enfin, parmi les cultivars intéressants, les plantes dont la taille réduite offre une meilleure résistance au vent, ont été aussi plus particulièrement retenues.

Tous les groupes importants sont triploïdes; ce sont :

AAA : comprenant tous les bananiers cultivés pour le commerce international (bananes douces consommées crues de la série "Cavendish" essentiellement et "Gros Michel").

AAB : recouvrant l'ensemble des bananes plantains (bananes à cuire en culture vivrière) "Mysore", très commun en Inde et Prata au Brésil.

ABB : groupe très important bien que, deux cultivars voisins seulement "Bluggoe" et "Silver Bluggoe" aient une répartition géographique globale. Les fruits sont généralement consommés cuits.

5-2 : Biologie et agents pathogènes.

Etant donné le faible pouvoir pénétrant des racines déjà mentionné, la culture bananière requiert des sols légers, bien aérés. Les bananiers ne supportent aucune stagnation prolongée de l'eau dans le sol, ni une trop longue sécheresse. C'est une culture particulièrement exigeante au niveau des apports en eau (100 à 150 mm/mois) et cette eau doit être répartie très régulièrement. La température optimale de culture est de 25°C, et ne doit jamais descendre en-dessous de 12°C, seuil critique pour les fruits. Les bananiers n'ont pas de besoins particuliers pour la fertilité des sols à condition toutefois que ceux-ci soient suffisamment riches en potassium (exportation de 1700 Kg/ha/cycle de production).

Les agents pathogènes du bananier sont nombreux et particulièrement virulents dans les conditions de culture intertropicale; ce sont des insectes (le charançon : Cosmopolites sordidus Germat), des nématodes (Radophylus similis Cobb), des champignons (maladie de Sigatoka, Cercosporiose due à

Mycosphaerella musicola Leach et M. fijiensis Morelet; maladie de Panama , fusariose causée par Fusarium oxysporum var. cubense Smith; des bactéries (maladie de Moko occasionnée par Pseudomonas solanacearum Smith et des virus (principalement le Bunchy Top). Dans certains cas, on dispose de moyens de lutte efficaces mais coûteux (insecticides, épandage d'huiles sur le feuillage contre la cercosporiose), dans d'autres cas, les seules méthodes de lutte sont l'éradication systématique et une protection contre les insectes dans le cas de virus, l'emploi de variétés résistantes (série " Cavendish ") dans le cas de la maladie de Panama.

B. Amélioration du bananier.

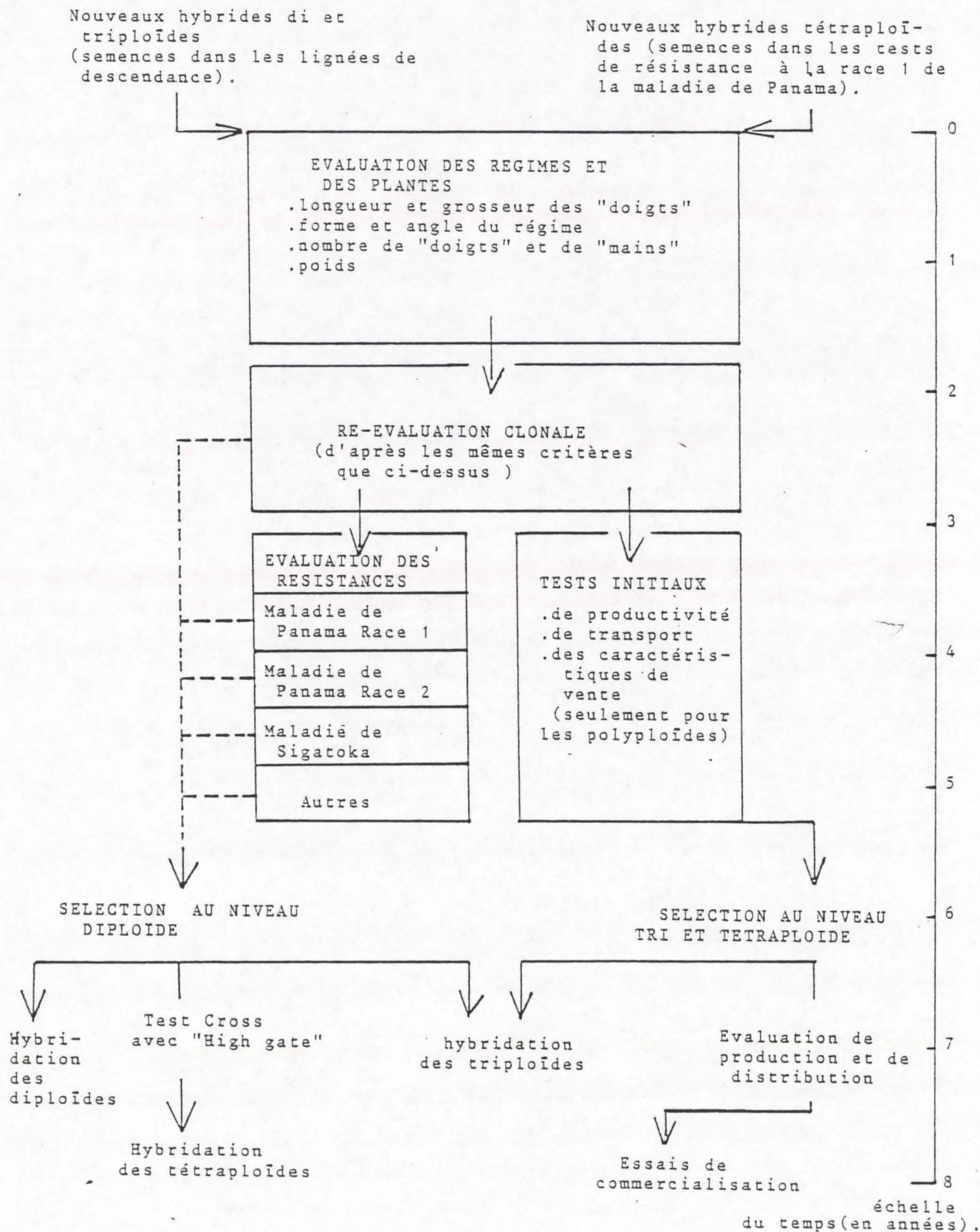
1°) Amélioration génétique.

La préoccupation principale des améliorateurs a été de doter les cultivars existants (dont on désirait garder les caractéristiques de qualité, de production et de commercialisation), de résistances naturelles aux principaux agents pathogènes principalement aux maladies du Sigatoka et de Panama) tout en maintenant une taille réduite pour leur assurer une meilleure résistance aux vents. Une diminution voire une suppression des traitements doit faire abaisser les coûts de production au niveau des grandes exploitations et être plus compatible avec un type plus classique de culture vivrière, très importante dans le tiers monde.

Les rendements ayant toujours été jugés suffisants par les producteurs, ce critère n'a jamais été l'objectif prioritaire dans les programmes de sélection.

Les schémas de sélection doivent tenir compte de quatre caractéristiques essentielles, propres aux cultivars de bananiers actuellement exploités et qui ont été déjà citées : la ploïdie, la stérilité, la parthénocarpie et la multiplication végétative.

Fig n° 6 : Schéma de sélection dans l'amélioration du bananier (d'après MENENDEZ et SHEPHERD, 1975).



Il existe une grande différence entre un bananier diploïde et un triploïde, tant au point de vue de la vigueur que du rendement. Les tétraploïdes sont peu différents des triploïdes si ce n'est qu'ils présentent une grande faiblesse des feuilles au niveau des gaines et des nervures principales. Le niveau pentaploïde semble être le niveau supérieur limite de ploïdie, les pseudo-troncs étant faibles, les feuilles très épaisses et la vitesse de croissance très réduite. En fait, le niveau triploïde apparaît comme étant le niveau optimal de ploïdie.

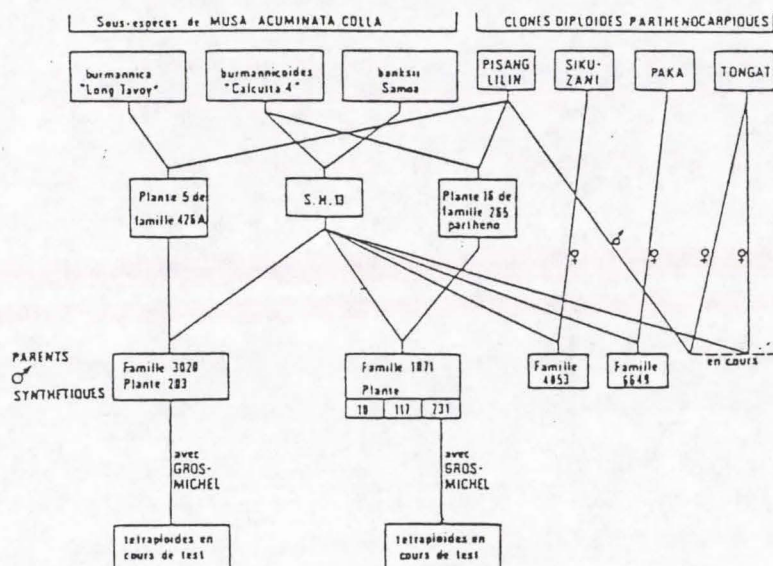
La stérilité, plus ou moins stricte selon les cultivars, est l'un des facteurs limitants des programmes d'hybridation. Parmi les cultivars destinés à l'exportation, elle est "stricte" dans la série "Cavendish" et relative dans la série "Gros Michel", où l'on retrouve fréquemment des noyaux de restitution ($3 \times$) après la méiose.

Enfin, la multiplication végétative est un atout important dans un programme d'hybridation puisqu'elle permet de reproduire à l'infini (en théorie), une structure génétique isolée, intéressante.

Le schéma de sélection entrepris par les équipes anglaises et américaines, repose sur le croisement de bananiers triploïdes AAA "Gros Michel" avec un diploïde, sauvage AA (M. acuminata, ssp. malaccensis, Simmond) ou ssp. banksii Simmonds) qui présente de bonnes caractéristiques de résistance. Les travaux entrepris ont demandé des moyens gigantesques puisque l'on estime qu'il faut polliniser 5 à 10 fois plus de régimes soit 600 à 1200 fois plus de fleurs, que l'on désire obtenir de plantes en test.

Ces croisements ont abouti à l'obtention des tétraploïdes primaires qui présentaient une partie des résistances désirées, mais les fruits et la forme du régime étaient trop éloignées du type "Gros Michel". Les back - cross de ces tétraploïdes avec des diploïdes AA (fig.6) ont donné une descendance

Fig. n° 7 : Création de parents mâles synthétiques.
(d'après SIMMONDS, 1962)



triploïde mais encore plus éloignée du type standard.

Il est apparu, alors, la nécessité d'améliorer le géniteur mâle diploïde, parthénocarpique à partir de souches sauvages et cultivées diploïdes portant les caractères voulus, et de l'utiliser directement sur " Gros Michel " pour produire directement des tétraploïdes (fig. 7).

A l'heure actuelle, après 60 années de travaux d'hybridation, aucun produit de ces croisements n'est cultivé en remplacement des types standard ("Cavendish" entre autres); en effet, les tétraploïdes obtenus, bien qu'ils portent les résistances désirées, ne donnent pas de régimes commercialisables. Ils sont néanmoins plantés dans certaines régions pour une consommation locale où la configuration du régime n'est pas un caractère primordial.

2°) Utilisation des techniques de culture *in vitro* pour l'amélioration du bananier.

2.1 : Historique des travaux déjà réalisés en culture *in vitro*.

Les premiers travaux effectués *in vitro* chez le bananier datent d'une vingtaine d'années et ont consisté en la mise au point d'une technique de culture d'embryons zygotiques (COX et coll., 1960). Ils ont permis de résoudre le problème de la mauvaise germination des graines et d'augmenter ainsi le nombre d'individus à tester dans la descendance d'un bananier hybride.

Plus récemment, la multiplication clonale et accélérée du bananier a fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Les parties du végétal mises en culture sont diverses et prélevées soit au niveau de l'inflorescence, soit au niveau de l'appareil végétatif :

- MA et SHII (1978) ont obtenu directement la formation de pousses végétatives sur des sections d'inflorescences. Ces pousses ont pu être isolées et repiquées.

- Le développement de jeunes plantes à partir de sommets de rejets (cf. fig.2) a retenu l'attention de nombreux auteurs (VESSEY, 1981; DORE, 1982/83; MOHAN RAN, 1983; MANTHE et coll., 1983; CRONAUER et coll., 1984).

La technique employée est, en général, identique. Après avoir été épluchés et stérilisés, les sommets sont coupés longitudinalement en quartiers et déposés sur des milieux comportant des cytokinines. Les jeunes plantes sont isolées un à deux mois après la mise en culture des fragments de rejets. Le nombre de plantes isolées en culture in vitro est nettement plus important que celui obtenu par les méthodes de "forçage" traditionnelles (BARKER, 1959). Les auteurs attribuent, cette prolifération de plantes in vitro au débourrement des bourgeons axillaires portés par la tige. L'enracinement ainsi que le repiquage des plantes en terre ne posent aucun problème particulier.

Parallèlement à ces travaux, la culture d'apex a été également utilisée pour débarrasser le bananier de certaines infections virales (BERG et coll., 1974).

Enfin, des travaux de multiplication non conforme (NOZERAN et BANCILHON-ROSSIGNOL, 1977) ont été entrepris visant à accroître la variabilité existante. Ainsi CRONAUER et coll. (1983) ont cultivé des cellules de bananiers isolées à partir de cals de fragments de tige d'un clone ABB. Ces auteurs indiquent qu'ils ont obtenu, dans des milieux liquides, des embryons. A partir d'eux ils ont provoqué le développement de la racine mais jamais de la tige.

La variabilité peut être accrue en employant des techniques d'irradiation ou de mutagenèse. Dans cette optique, GUZMANN et coll. (1978) ont traité aux rayons gamma des apex de bananiers cultivés in vitro. L'irradiation ménagée a provoqué des mutations qui touchent la morphologie et le développement de la plante.

Dans les travaux effectués jusqu'à présent sur le bananier et ci-dessus exposés, il est souvent difficile de séparer ce qui revient à la multiplication conforme et non conforme (NOZERAN et BANCILHON-ROSSIGNOL, 1977). D'ailleurs certains chercheurs semblaient mésestimer que le passage par le cal pouvait conduire à la création d'une certaine variabilité. C'est le cas par exemple de SRINIVASA et coll.(1982), de MOHAN RAM et coll.(1964) qui, pour essayer de mettre au point une méthode de multiplication accélérée et conforme, ont utilisé des tissus inflorescentiels et ont cherché à produire des cals à partir de ces tissus. Ils ont réussi à produire des cals, mais, sur ces derniers, aucun phénomène d'organogenèse n'a été observé.

2-2. Cadre de nos recherches.

Dans notre travail, nous nous sommes attaché à bien différencier ce qui relève de ces deux domaines (multiplication conforme et non conforme). La multiplication végétative dite conforme où il y a stimulation du développement d'une structure méristématique préexistante ou néoformation directe d'une tige sur l'explant sans passage par un cal, permet en général de reproduire une structure génétique identique à elle même. A l'inverse, dans la multiplication végétative dite non conforme, qui peut être créatrice de variabilité, intervient principalement une étape intermédiaire de callogenèse, plus ou moins importante, avant toute apparition de néoformations, ce cycle pouvant d'ailleurs être répété plusieurs fois....

On sait, en effet, à l'heure actuelle, au moins chez un certain nombre de plantes, obtenir des "embryoïdes" ou des bourgeons néoformés conduisant à des plantes entières à partir de cals (culture de tissus), de cellules isolées ou de protoplastes. De nombreux travaux effectués ces dernières années (LARKIN et SCOWCROFT, 1981; SCOWCROFT et LARKIN, 1982; MEINS, 1983; ORTON, 1983) ont

montré que, lorsque l'initiation des individus néoformés passait par une étape plus ou moins importante de prolifération anarchique, ils pouvaient être différents de la plante de départ; les différences pouvant porter sur la structure du patrimoine génétique ou sur son expression.

Pour le bananier, où la stérilité quasi-complète des principaux cultivars empêche, le plus souvent, toute utilisation des méthodes classiques de sélection par hybridation, l'insertion, dans les programmes de sélection, de ces techniques de culture in vitro pour ^{élargir} une variabilité s'avère indispensable. L'une d'entre elles, l'isolement et la culture de protoplastes, bien qu'étant particulièrement difficile à réussir chez les Monocotylédones (VASIL et VASIL, 1983), est sans doute la plus séduisante car elle permet ensuite tout un ensemble de biotechnologies nouvelles telles que l'hybridation somatique, l'introduction du matériel nucléaire étranger, etc... Déjà dans ce domaine, des résultats intéressants ont été obtenus sur des plantes à intérêt économique telles que la Pomme de terre (SHEPARD et al, 1983) ou des céréales (blé, orge par exemple (DAVEY, 1983)).

Mais cela ne doit pas nous faire oublier que la multiplication végétative conforme in vitro a aussi son importance car cette méthode permet une propagation plus rapide d'une structure génétique intéressante que les méthodes de forçage traditionnelles. Aussi notre travail a trait aux deux volets de la multiplication végétative conforme et non conforme.

Les études de multiplication conforme que nous avons réalisées ont eu lieu à partir de méristèmes à l'état végétatif et floral. Parallèlement, nous avons précisé les conditions de culture des plantes in vitro. Les observations morphologiques ont été couplées avec une étude anatomique. Cette dernière doit, en effet, nous permettre de déterminer le site d'initiation des nouveaux méristèmes caulinaires. Des hypothèses quant aux éventuelles conséquences génétiques que cette technique peut entraîner seront exposées.

Nous avons recherché, par ailleurs, une maîtrise des processus qui conduisent à l'élargissement de la variabilité. Pour cela, dans une première étape, nous avons essayé de cerner les facteurs importants qui régissent une callogenèse abondante chez le bananier (origine de l'explant, conditions de culture). Dans un second temps, nous avons essayé d'obtenir sur les cals. des néoformations caulinaires dont nous avons analysé, autant que faire se peut, les caractéristiques.

Enfin, conjointement et dans le même but, des isolements et mises en culture de cellules isolées et de protoplastes ont été effectués.

II - MATERIEL et METHODES.

A) Matériel végétal.

1°) Matériel prélevé in situ.

Le matériel végétal nous est parvenu par avion des régions tropicales. Les conditions de prélèvement, de transport (soute ou habitacle de l'avion par exemple) ainsi que le temps écoulé entre la récolte du matériel et sa mise en culture (2 à 15 jours) sont très variables. Il existe donc une grande hétérogénéité de l'état physiologique et sanitaire des explants primaires qui ont été utilisés.

- Ces explants ont été prélevés sur des parties végétatives (rejets) et florales (inflorescences) :

. Les rejets utilisés appartiennent à deux cultivars triploïdes stériles et parthénocarpiques : "Américani" (AAA) de la série "Cavendish" (banane douce) et "French Plantain" (AAB) de la série Plantain (banane à cuire). Provenant de Côte d'Ivoire, ils avaient des feuilles étalées coupées et étaient en assez mauvais état à leur arrivée (gainnes foliaires noircies et nécrosées).

. Les inflorescences, en provenance de la Guadeloupe et du Cameroun, ont été employées à des stades de développement variables (inflorescence en phase femelle interne ou bien en phase mâle (cf. Fig. 2)). Celles dont l'apparence n'est pas saine, c'est à dire qui présentent des bractées nécrosées ou trop flétries et un point terminal noirci ont été éliminées. En outre, celles qui n'ont pas pu être mises en culture immédiatement ont été entreposées à l'obscurité dans une pièce ventilée à 18°C.

Le matériel floral a une origine génétique plus diversifiée. Il comprend des espèces sauvages, diploïdes, séminifères (Musa acuminata Colla ssp. malaccensis Simmonds (AA); Musa balbisiana Colla (BB), ainsi que des cultivars

triploïdes, parthénocarpiques et stériles "Poyo" "Grande Naine" et "901" (AAA) de la série "Cavendish".

2°) Jeunes plantes cultivées in vitro.

Pour certaines expériences, des plantes cultivées in vitro ont été employées. Elles sont issues de la mise en culture de sommets fragmentés de rejets et de la multiplication accélérée des plantes obtenues à partir de ceux-ci (cf. p.37). Le matériel est alors stérile. Les plantes qui sont toutes à l'état végétatif sont soit des espèces sauvages diploïdes (M.acuminata ssp. malaccensis et M.balbisiana) soit de cultivars triploïdes ("Américani", "French Plantain").

B) Méthodes.

1°) Composition des milieux de culture et des solutions enzymatiques.

1-1 : milieux de culture :

La grande majorité des cultures ont été faites sur un milieu de base MSb (cf. annexe II et III) dont la composition est constante et proche de celle du milieu (MS) de Murashige et Skoog (1962) avec 20 g/l de saccharose et 7 g/l d'agar s'il s'agit d'un milieu solide.

Selon les besoins, ce milieu de base peut être modifié par le changement de concentration de l'un ou plusieurs de ses composants (sels minéraux, saccharose). Ainsi, dans certains cas, les sels minéraux de Murashige et Skoog ont été remplacés par ceux de KNOP (GAUTHERET, 1959)^{ou ceux} du milieu N6 (CHU et coll, 1975) (cf. annexe III).

Le milieu de base peut être modifié aussi par l'addition de substances nouvelles telles que :

. des régulateurs de croissance :

- des auxines : acide indolacétique (AIA), acide naphthalène acétique (ANA), acide indolbutyrique (AIB), 2,4 dichlorophénol (2,4 D), 2,4,5 trichlorophénol (2,4,5 T)

- des cytokinines : benzylaminopurine (BAP), kinétine (K), diméthylallylaminopurine (2ip)

- du sulfate d'adénine

- des compléments organiques, sous forme d'extraits (hydrolysat de caséïne (H.C.), eau de noix de coco)

- L'hydrolysat de caséïne ayant été fréquemment utilisé, pour des raisons de commodités d'écriture, nous indiquerons dans le texte, sa présence dans les milieux de culture, à une concentration de 500 mg/l, par une astérisque placé en haut à droite du nom du milieu. Par exemple MSb^* = $MSb + 500 \text{ mg/l}$ d'hydrolysat de caséïne.

- des composés freinant l'effet toxique des phénols : des fixateurs des phénols (charbon actif), des réducteurs (acide citrique, acide ascorbique, cystéïne) ou de la caféïne.

- du tampon MES (10mM)^{est} ajouté aux milieux liquides afin de limiter les fortes variations de pH.

Toutes les modifications, apportées à la composition du milieu de base (MSb), seront indiquées ultérieurement dans le texte.

- Le pH est ajusté à 5,6 - 5,7 avec KOH ou HCl, après avoir ajouté la gélose (7 g/l) s'il y a lieu. Les milieux sont coulés en tubes avant l'autoclavage (20 mn, 115°C), à raison de 20 ml par tubes, ou bien après l'autoclavage, en boîte de pétri. Les substances fragiles, thermosensibles (eau de noix de coco par exemple) ainsi que les milieux liquides sont stérilisés par filtration au filtre millipore à 0,22µ. Les cultures sont faites en boîte de Pétri ou en tubes. Les premières sont repiquées tous les 30 jours en moyenne, et les secondes tous les 45 jours. Les changements dans le rythme de repiquage sont précisés dans le texte.

1-2 : solutions enzymatiques :

Les isolements de protoplastes ont été réalisés avec une solution enzymatique composée de la solution saline de CPW (Tableau I) (FREARSON et coll., 1967), à laquelle on ajoute 0,7 M de mannitol, et diverses enzymes à des concentrations variables (0,1 à 5 % poids/volume) :

. des pectinases : macérozyme YAKULT, Pharma-Indus, Japon), et pectolyase Y23 (SEISHIN, Pharma.Comp., Japon)

. des hémicellulases : hemicellulase (SIGMA, Chemi.comp., USA) et rhozyme (POLLOCK et POOL CTD, USA) ,

. des cellulases : cellulase R - 10 "ONozuka" (YAKULT, Pharma. Indus., Japon ,) cellulysin (CALBIOCHEM - BEHRING, USA) et driselase (KYOWA HAKKO KOGYO Co CTD, Japon).

Tableau n° I : Composition de la solution saline de CPW

(Cell and Protoplast Washing solution).

	en mg/l
KH_2PO_4	27,2
KNO_3	10,1
$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	1480
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	246
KI	0,16
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,025

Le pH des solutions est ajusté à 5,6 avec KOH. Les solutions sont stérilisées sur filtre millipore à 0,22µ.

2°) Stérilisation et conditions de mise en culture des explants.

La stérilisation a été faite sur des sommets de tiges prélevés sur les rejets, sur des inflorescences dans la partie appelée bourgeon mâle, dont les fleurs mâles sont protégées par des bractées recouvrantes et enfin, sur des ovaires de fleurs femelles.

Avant la stérilisation les rejets sont taillés et épluchés jusqu'à l'apparition de gaines foliaires saines et les bourgeons mâles débarrassés des bractées et fleurs âgées nécrosées.

2-1 : Méthode de stérilisation.

Le protocole de stérilisation généralement suivi est le suivant :

- lavage à l'eau courante
- bain de Mercryl laurilé pur (2 mn)
- deux rinçages à l'eau stérile (de 5 mn chacun)
- bain d'hypochlorite de calcium à 8 % (20 mn)
- deux rinçages à l'eau stérile (de 5 mn chacun)
- épluchage (pour les rejets et bourgeons mâles)
- bain d'hypochlorite à 3 % (20 mn)
- deux rinçages à l'eau stérile (de 5 mn chacun)

Dans certains cas, lorsque le matériel est fragile (des fleurs isolées par exemple), on utilise un seul bain d'hypochlorite de calcium à 3 %.

Lorsque les inflorescences mâles sont suffisamment saines et les bractées bien recouvrantes, le bourgeon mâle est plongé directement dans l'alcool à 90° pendant 5 mn, puis flambé. Après un épluchage de cinq à six "mains", l'opération de stérilisation est renouvelée.

2-2 : conditions des pièces de culture :

Les cultures sont faites, en général, dans des pièces climatisées, à 27°C, 70 % d'humidité relative, à l'obscurité totale, ou à la lumière (éclairage 16 h/24 h, 60 $\mu\text{Einst.cm}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ P.A.R.; tubes Philips TLS 40W33). Toute modification de ces conditions de culture sera indiquée dans le texte.

3°) Mise en culture d'explants pourvus de régions méristématiques préexistantes.

3-1 : mise en culture de fragments de sommets de rejets :

Après la stérilisation, les rejets sont à nouveau taillés pour atteindre une taille finale de la "tige" d'environ 1 cm². Ils sont ensuite coupés longitudinalement en quartiers et déposés verticalement dans des tubes sur un milieu MSb contenant 1 mg/l de BAP. Les cultures sont mises une semaine à l'obscurité puis transférées à la lumière.

3-2 : mise en culture de bourgeons inflorescentiels.

Les implantations préliminaires, effectuées à partir de bourgeons mâles, ont été faites sur tous les génotypes en notre possession (diploïdes et triploïdes).

Les inflorescences, au stade mâles, après avoir été stérilisées sont épluchées jusqu'à une taille finale de 3 à 5 cm de hauteur. Ces dernières, d'une couleur blanche laiteuse, sont coupées verticalement en quatre et mises en culture en tubes sur des milieux MSb contenant de l'ANA^{et}/ou de la BAP en proportions variables.

Par la suite, l'expérience a été répétée avec des bourgeons mâles, alors découpés en tranches de 5mm d'épaisseur de cv."901" de la série "Cavendish" en utilisant seulement deux milieux MSb contenant l'un de l'ANA (10 mg/l), l'autre de l'AIA (2 mg/l) et de la K (2 mg/l) et tous deux 500 mg de H.C.

Toutes les cultures sont placées à l'obscurité.

4°) Mise en culture d'explants ne possédant pas, à priori, de régions méristématiques.

4-1 : composition des milieux et conditions de culture.

Les tous premiers essais de callogénèse ont été effectués avec une gamme restreinte de milieux, solides, coulés en tubes. Ces milieux sont composés du milieu MSb additionné de 500 mg/l d'hydrolysate de caséine et des régulateurs de croissance à différentes concentrations (du 2,4 D ou de l'ANA seul ou de l'ANA associé à de la BAP (tableau II). Par la suite, nous avons utilisé un plus large éventail de combinaisons d'auxines et de cytokinines. Chaque milieu est testé sur un effectif de 48 explants. La moitié est placée à la lumière, l'autre à l'obscurité.

Tableau n° II : Composition des milieux utilisés dans les premiers essais de callogenèse.

Milieux Régulateurs de croissance (Poids/volume)	D ₁₀	D ₁	D _{0,1}	N ₁₀	N ₁	N _{0,1}	N ₁ B ₁	N ₁ B _{0,5}	N ₁ B _{0,1}	témoin
2,4 D	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷							
ANA				10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	
BAP							10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	

4-2 : nature du matériel végétal.

Les expériences de callogenèse ont été menées sur du matériel végétatif et floral.

- Nous avons mis en culture des fragments de racines et de feuilles prélevées sur des plantes du cv. "Américani" de la série Cavendish cultivées in vitro soit à la lumière (les feuilles sont alors vertes) soit à l'obscurité (les feuilles sont blanchâtres). Dans ce dernier cas, nous parlerons de plantes étiolées. Les fragments d'organes sont ensuite déposés verticalement ou longitudinalement sur les milieux.

- Le matériel floral est le même, en partie que celui qui est utilisé pour la mise en culture des bourgeons mâles, il est de moins en moins développé au fur et à mesure qu'il est prélevé dans une zone proche de la partie proximale de l'inflorescence. Nous avons mis en culture des fleurs complètes mais aussi des pièces florales (bractées, ovaires, styles, stigmates et anthères), entières ou fragmentées, et des sections d'axes inflorescentiels.

- Par ailleurs, nous avons également implanté après stérilisation, des ovaires prélevés sur des inflorescences de cv. "Poyo" de la série "Cavendish" en phase femelle. Ceux-ci sont sectionnés en tranches, d'au plus 5 mm d'épaisseur, déposées à plat sur les milieux.

5°) Techniques utilisées.

5-1 : Technique d'isolement de protoplastes.

Le matériel est hâché finement et placé dans une solution enzymatique contenant 2,5 % (poids/volume de cellulase R-10, 0,2 % d'hémicellulase, 0,3 % de pectolyase Y₂₃ et 0,6 % de macérozyme.

La suspension est placée en agitation lente (80 rp/mn) à l'obscurité à 27°C pendant 9 heures. Après l'incubation, la suspension est filtrée (maille 83 μ) et diluée au 4/5ème avec une solution saline de KMC (HARMS et POTRYKUS, 1978). Elle est ensuite centrifugée à 100 g pendant 5 minutes. Le culot est récupéré dans la solution KMC. L'observation est faite en boîte de Pétri ou dans une cellule de Nageotte.

5-2 : Techniques cytologiques.

5-2-1 : fixation.

Tout le matériel destiné à une observation microscopique, est fixé dans l'alcool acétique (alcool éthylique à 100° (3 V), acide acétique pur (1 v)), pendant au moins 24 h.

5-2-2 : observations histologiques (annexe IV A)

A la sortie du fixateur, les tissus sont déshydratés, inclus dans la paraffine et coupés au microtome à 7 μ d'épaisseur. Les lames

sont déparaffinées puis colorées au bleu alcian-safranine. Les parois celluliques des cellules apparaissent alors en bleu clair, le xylème et les nucléoles en rouge, le cytoplasme dense, des cellules en division, en violet.

Des observations histologiques ont aussi été faites sur des coupes pratiquées à main levée, sans que le matériel ait été préalablement fixé. Les coupes sont plongées dans l'eau de Javel puis colorées au carmino-vert de Mirande.

5-2-3 : technique de comptage chromosomique par écrasement

(annexe IV B).

Des pointes racinaires blanches et vigoureuses sont prélevées sur des plantes cultivées in vitro.

Elles sont prétraitées dans une solution d' α - mono-bromonaphtalène, ce qui permet un blocage des divisions au stade métaphase.

Après avoir subi la fixation précédemment indiquée, les racines sont placées pour la coloration dans du carmin chlorhydrique.

Le montage a lieu dans une goutte de carmin acétique et passage à la flamme. Il est suivi d'un écrasement entre lame et lamelle.

La préparation peut être observée immédiatement au microscope à contraste de phase ou bien, après dessèchement des lames au microscope optique normal.

Un nombre total de 5 plaques sont examinées pour chaque clone.

5-3 : Méthode statistique.

Au cours d'un cycle de multiplication accélérée, nous avons cherché à déterminer d'une part l'influence de l'incision verticale du méristème végétatif, d'autre part, celle du milieu et enfin de l'interaction entre les deux.

Pour cela nous avons choisi, compte tenu du dispositif expérimental, d'utiliser un modèle mathématique du type croisé fixe à deux critères de classification, avec répétitions :

$$X_{ijk} = \mu + a_i + b_j + (ab)_{ij} + E_{ijk}$$

X_{ijk} : variable aléatoire égale au même résultat du traitement ij
avec $k = 1, \dots, n$ (1,2,3).

μ : moyenne générale

a_i : effet dû à la coupure du méristème végétatif avec
 $i = 1, \dots, p$ (1,2); $\sum a_i = 0$

b_j : effet dû au milieu (MS_b ou $MS_{A_5 B_{7,5}}$) avec $j = 1, \dots, q$ (1,2) $\sum b_j = 0$
 $(ab)_{ij}$: effet dû à l'interaction entre le traitement coupure et le milieu
avec $\sum (ab)_{ij} = 0$.

E_{ijk} : variable aléatoire d'espérance nulle et de variance γ liée aux facteurs non contrôlés.

III - RESULTATS.

A) Stérilisation des explants primaires.

Le matériel végétal qui nous a servi de point de départ pour l'ensemble de notre travail a consisté ^{soit} en des fragments de rejets végétatifs, soit en des portions inflorescentielles ou florales, appartenant à divers cultivars (cf. matériel et méthodes). Nous allons exposer, en premier lieu et très brièvement, les résultats concernant en particulier l'efficacité de la méthode de stérilisation employée (méthode plus longue avec passage successivement dans une solution de Mercryl, puis d'hypochlorite de calcium et plusieurs rinçages ensuite - méthode plus rapide avec un trempage rapide dans l'alcool éthylique à 90°, sans rinçage ultérieur)(cf. matériel et méthodes).

1°) Stérilisation du matériel végétatif : Pour ce type de matériel, la stérilisation a toujours été effectuée en adoptant la méthode la plus longue. On a pu constater alors, et cela aussi bien avec le cv. "Américani" (AAA) que "French Plantain" (AAB) que, sur un effectif de 34 tubes contenant chacun 1/4 de sommet de rejet coupé longitudinalement, aucun des explants n'a présenté de signes d'infection et que tous sont restés vivants à l'exception toutefois de quatre d'entre-eux faisant partie d'un même rejet qui, vu son état sanitaire défectueux, avait dû être sévèrement épluché et taillé.

2°) Stérilisation du matériel reproducteur : Avec ce matériel les deux méthodes de stérilisation ont été appliquées, celle à l'alcool 90° ayant servi pour les bourgeons mâles en bon état sanitaire et l'autre, dans tous les autres cas, en prenant soin, cependant, de la moduler suivant l'état du matériel utilisé. Ainsi pour des tissus fragiles et directement exposés à l'action des produits

tels que des parties de la fleur (pièces du péricarpe ou anthères développées) on a procédé à un seul bain d'hypochlorite à 3 %, tandis que pour des tissus bien protégés, on en a effectué normalement deux.

En ajustant ainsi comme nous venons de le rappeler, la stérilisation au matériel végétal, nous avons obtenu là encore des résultats très satisfaisants puisque, à nouveau, aucune infection n'a été décelée dans la plupart des cas.

Toutefois, des fragments d'ovaires prélevés, sur quelques inflorescences du cv. "Grande Mame", en provenance de Guadeloupe, ont montré, après 7 jours de culture, un anneau infectieux au contact de l'explant avec le milieu, dans le prolongement des vaisseaux de l'ectocarpe. Cette infection a progressivement disparu au fil des repiquages de ces explants. Mais, des cals apparemment sains, obtenus à partir de ces explants, se sont révélés être infectés lorsqu'ils ont été isolés et repiqués sur le même milieu mais neuf. L'infection de ces cals, dans les conditions de cultures normalement utilisées, c'est à dire à 27°C, s'est manifestée au bout de 3 à 4 jours après le repiquage et encore plus rapidement à 35°, où elle apparaît dès le lendemain du repiquage. On peut noter aussi, à ce niveau, que les cultures de portions des bourgeons inflorescentiels d'où avaient été prélevés les ovaires ont présenté également le même type d'infection.

Une détermination rapide de l'agent pathogène, par les méthodes microbiologiques classiques, a montré qu'il pouvait s'agir d'une bactérie du type Acinetobacter bacillus (G⁻).

3°) Conclusions.

La méthode de stérilisation la plus longue, et qui est aussi celle qui a été la plus fréquemment employée, comporte en particulier, nous l'avons dit, un passage dans un bain de Mercryl avant la stérilisation proprement dite à l'hypochlorite. Cette méthode est très satisfaisante puisqu'elle aboutit à un pourcentage d'infection nul d'explants qui sont par ailleurs restés vivants dans la presque totalité des cas, (une seule exception pour un rejet, qui, vu sa petite taille ^à la suite d'un sérieux épluchage, n'a pas supporté cette stérilisation).

Dans le cas du bananier, l'utilisation d'un mouillant tel que le Mercryl est importante. En effet, compte tenu de la nature cireuse des tissus, l'hypochlorite seul, ne peut atteindre les tissus profonds des explants, en particulier, la base des gaines foliaires des rejets qui, à leur aisselle, contiennent de nombreux germes. L'emploi d'un mouillant permet donc de renforcer l'action de l'hypochlorite. De plus, l'efficacité du Mercryl tient non seulement, à son rôle de mouillant, mais aussi à ses propriétés désinfectantes (fongicides et bactéricides). Cependant, néanmoins, ce produit a le désavantage d'être très difficile à éliminer ensuite. Aussi malgré plusieurs rinçages à l'eau stérile, il est fréquent d'en retrouver des traces sur les tissus profonds, les mieux protégés (sur les fleurs mâles, entre les bractées par exemple). Il faut alors isoler chaque explant et le rincer abondamment à l'eau stérile.

La méthode de stérilisation à l'alcool à 90° que nous avons utilisée avec les bourgeons mâles, est avec ce matériel souvent aussi efficace que la méthode générale mais beaucoup plus rapide et surtout, d'une facilité de manipulation beaucoup plus grande. Toutefois cette technique suppose que les bourgeons inflorescentiels soient dans un bon état de conservation, c'est à dire que les bractées soient bien jointives, non flétries et que le point terminal de

l'inflorescence ne soit pas noirci (ce dernier caractère indiquant, en général, une nécrose avancée des tissus plus internes). Finalement cette méthode a été retenue pour les bourgeons mâles et ce, aussi souvent que leur état sanitaire le permettait.

La bactérie responsable des infections d'origine interne que nous avons observées sur des tranches d'ovaires et sur des portions inflorescentielles se situe vraisemblablement dans le matériel in vivo. Bien qu'elle ne se manifeste plus ensuite au cours du 2ème ou 3ème repiquage des explants, elle peut réapparaître à tout moment, à l'occasion en particulier, de l'isolement d'un cal et de son repiquage. Nous pensons, qu'il est préférable de se débarrasser immédiatement des explants primaires qui présentent ces infections et d'envisager dorénavant leur détection rapide en les plaçant 24 heures à 35°C. L'agent responsable est vraisemblablement un Acinetobacter bacillus (G-). Cette bactérie est sensible à de nombreux antibiotiques (tels que la streptomycine, la gentamycine ou la tétracycline) mais pas à la pénicilline. L'adjonction d'antibiotiques à large spectre d'action, tels que la tétracycline, déjà utilisée en culture in vitro (POLLOCK et coll., 1983), pourrait être alors envisagée, lors des premiers repiquages, dans les cas où cela s'avèrerait indispensable.

Toutefois il est intéressant de signaler que, à notre connaissance la présence de cette bactérie, le plus souvent contenue dans l'eau et dans le sol (BERGEY'S (1974)), n'a jamais été décrite chez le bananier, dans les conditions de culture habituelles.

B) Multiplication végétative conforme in vitro.

1°) A partir de méristèmes végétatifs.

1-1 : Mise en culture de sommets de rejets prélevés in vivo.

1-1-1 : Apparition de pousses végétatives.

Des sommets de rejets prélevés in vivo, sur deux cultivars "Américani" et "French Plantain", ont été fragmentés verticalement en plusieurs parties qui ont été mises en culture in vitro, dans le but de constituer rapidement à partir de celles-ci, et, en conditions aseptiques, un stock de plantes homogènes qui pourrait servir de matériel de départ ensuite pour d'autres expériences (callogenèse entre autres). Nous nous sommes contenté de reproduire un protocole qui avait déjà été mis au point au Groupement d'Etude et de Recherche de Développement et d'Agronomie Tropicale (G.E.R.D.A.T.) à MONTPELLIER et notre travail, au cours de cette première étape, a consisté essentiellement en une description précise de l'apparition des nouvelles plantes formées après section des rejets.

Après stérilisation, tous les explants primaires mis en culture sur milieu MSb + BAP à 1 mg/l (à l'exception de quatre d'entre eux, voir p 35) sont restés vivants et même ont présenté assez vite des signes de reprise du développement (Pl. I₁).

Le milieu manifeste lui, dès les premiers jours, un noircissement intense qui paraît toutefois plus marqué pour les explants de "French Plantain" que pour ceux du cv. "Américani". Aussi, nous avons jugé préférable de transférer au bout d'une semaine, toutes les cultures sur le même milieu, mais neuf.

Les explants de cv. "Américani" sont placés à la lumière après 15 jours de culture; ils verdissent alors qu'ils étaient blancs à l'obscurité. Dans le même temps, on note un gonflement des tissus situés à la base du fragment de

tige et aussi à la base des gaines foliaires les plus âgées, ces dernières s'écartant d'ailleurs de plus en plus nettement les unes des autres (Pl. I₂). Au bout de 45 jours, des petites pousses végétatives vertes, dont la forme est conique au début de l'initiation, apparaissent sur les explants au niveau des trois ou quatre aisselles foliaires les plus âgées (le sommet du rejet avant sa fragmentation en comportant 7 en moyenne). Nous avons obtenu 5 à 6 pousses par explant, soit une vingtaine au moins par rejet et avons constaté qu'il est possible d'en trouver plusieurs sur les explants issus d'un même rejet au niveau d'une même aisselle foliaire, (de 1 à 4 par aisselle).

Les nouvelles plantes sont isolées des explants au bout de 50 jours environ de culture (lorsqu'elles mesurent au moins 1 cm) et sont repiquées sur le milieu de base (MSb), additionné ou non de BAP (1 mg/l). Celles-ci sont alors à des stades de développement variables, les plus grandes étant apparues le plus précocement.

Les réactions des explants du cv. " French Plantain" sont identiques à celles que nous venons d'observer pour les explants du cv "Américani" mais elles sont plus lentes et le nombre de pousses végétatives produit est plus faible, de l'ordre de 12 à 15 par rejet. Ces dernières sont isolées et repiquées seulement au bout de 70 jours environ de culture.

1-1-2 : Entretien in vitro d'un stock initial de plantes.

Les plantes isolées des explants primaires ne se développent pas de la même façon lorsqu'elles sont repiquées sur un milieu MSb contenant ou non de la BAP (1 mg/l).

Sur le milieu témoin MSb, l'aspect général de la partie aérienne des plantes se rapproche de celui que l'on peut observer in vivo, mais présente, cependant, certaines caractéristiques morphologiques particulières (Pl. I₃). Ainsi, nous avons remarqué que, in vitro, les gaines foliaires n'étaient pas étroitement

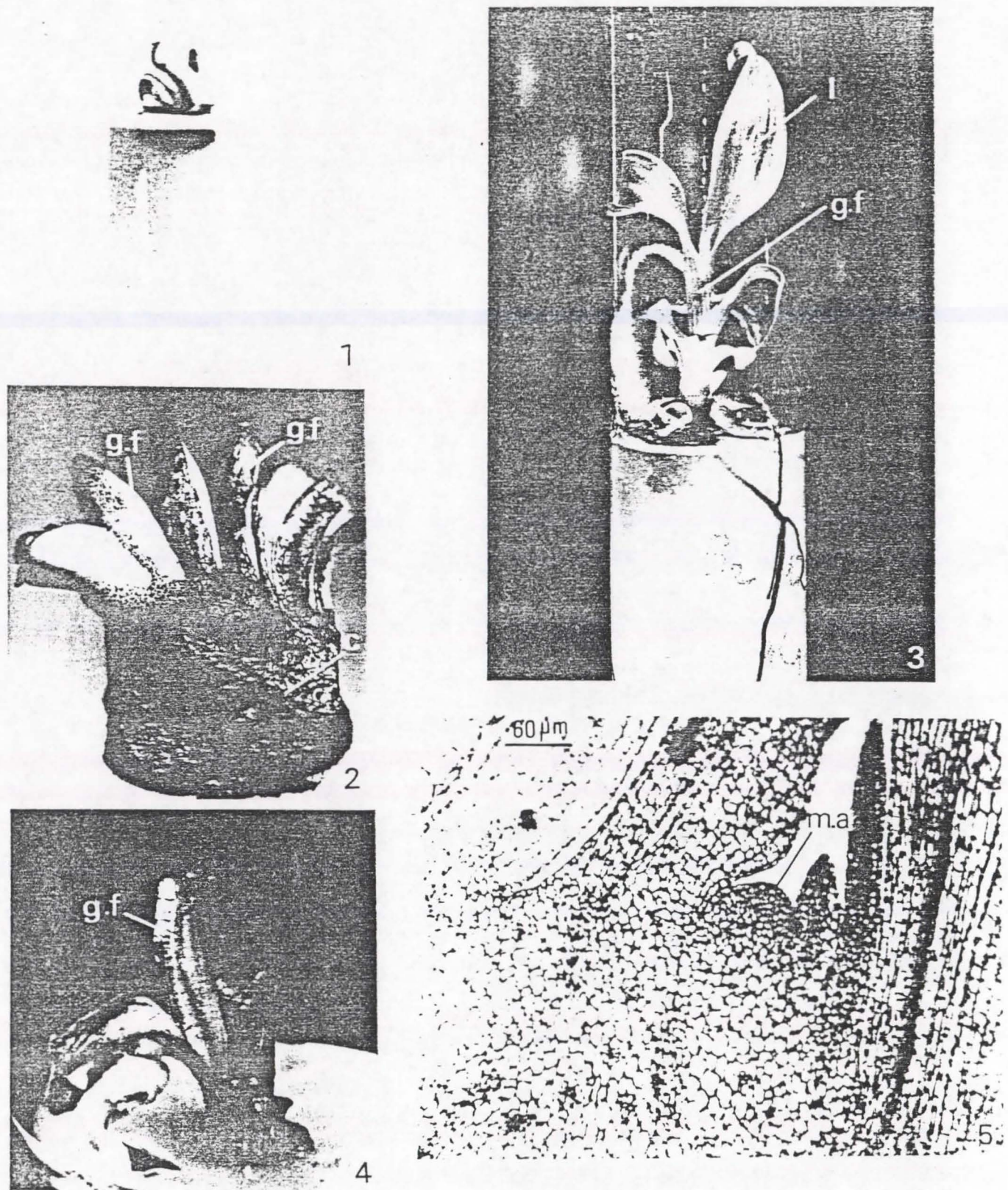


Planche I: 1-2-3: Mise en culture d'explants issus d'apex de rejets *in vivo*. 1: explant après 10 jours de culture (milieu MS_b + BAP à 1 mg/l); 2: écartement des gaines foliaires après 30 jours de culture (MS_b + BAP à 1 mg/l); 3: bananier isolé cultivé *in vitro*.
 4-5: Multiplication végétative des bananiers déjà cultivés *in vitro*. 4: reprise du développement à partir d'un fragment du méristème apical; 5: coupe transversale de méristème terminal de bananier cultivé *in vitro*.
 c: corme; g.f.: gaine foliaire; l: limbe; m.a.: méristème apical.

accolées, ne formant pas ainsi de pseudo-tronc et que les nervures secondaires étaient parallèles ou obliques par rapport à la nervure principale de la feuille in vitro (cf. Fig 10. p. 78), mais jamais perpendiculaires à celle-ci comme chez les plantes adultes in vivo (cf. Fig. 2). Sur ce milieu on observe aussi que la croissance des plantes s'accompagne d'un allongement important des gaines foliaires (10 cm de haut au bout de deux mois pour les plus rapides) ainsi que d'un étalement important des limbes (6 à 10 cm de long et 2 à 4 cm de large) dont la couleur est vert sombre. Les racines apparaissent au bout de 10 jours environ. Elles sont fines (0,5 à 1 mm de diamètre) et grandissent rapidement, en formant un plus ou moins grand nombre de ramifications secondaires.

Les plantes, sur le milieu MSb enrichi en BAP, tout en conservant certaines des caractéristiques ci-dessus mentionnées montrent quelques modifications. Elle se développent beaucoup plus lentement : leur croissance, pendant le même laps de temps, est deux fois moins importante. Les gaines foliaires sont généralement plus courtes (elles ne dépassent jamais 5 cm de haut), les limbes, d'aspect gaufré et de teinte vert clair, sont de taille réduite (4 cm de long maximum). Les racines principales et secondaires, plus épaisses, apparaissent plus tardivement que précédemment, les dernières citées d'ailleurs, n'étant pas systématiquement présentées.

Au cours de ce premier repiquage et cela chez les deux cultivars, des nouvelles pousses végétatives sont apparues à la base des plantes isolées des explants primaires et ce, de façon tout à fait aléatoire, que le milieu contienne ou non de la BAP. Cette réaction ne s'est plus reproduite ensuite lors des repiquages ultérieurs.

Vu les résultats ci-dessus mentionnés, toutes les plantes obtenues sur les deux milieux ont ensuite été repiquées, tous les 45 jours, sur le milieu MSb. Celles provenant du milieu contenant de la BAP reprennent alors un aspect normal. A chaque repiquage, elles subissent une ablation systématique des racines, les feuilles sont coupées à une hauteur de 2 cm au-dessus de la tige vraie, et celle-ci est taillée en un cube de 5 à 7 mm de côté. Seules sont laissées intactes, les plantes qui n'ont pas atteint ces dimensions. En opérant, de cette façon, nous avons pu observer, au cours des repiquages successifs, une homogénéisation progressive des plantes.

1-2 : Multiplication végétative de bananiers déjà cultivés in vitro.

Dans une seconde étape de notre travail, nous avons cherché une méthode qui nous permette une multiplication active des bananiers à partir des plantes déjà cultivées in vitro. Dans ce but, nous nous sommes, bien entendu, servi des résultats déjà obtenus à partir des rejets in vivo par d'autres chercheurs déjà cités et nous nous sommes avant tout, intéressé à préciser l'origine histologique des nouvelles plantes obtenues. Cette étude nous permettra, par la suite, d'émettre des hypothèses relatives quant à la conformité de la méthode de multiplication employée.

1-2-1 : Effets de l'incision verticale de la tige et du milieu de culture.

Les essais de multiplication végétative accélérée à partir de bananiers déjà cultivés in vitro, ont été réalisés à partir de 12 plantes du cv. "Américani", coupés ou non verticalement en quatre fragments. Les explants

ont été repiqués en tubes sur deux milieux: MSb et MS_{A5B7,5} (soit MSb + AIA à 5 mg/l et BAP à 7,5 mg/l).

Le milieu MS_{A5B7,5} a été choisi en fonction de travaux déjà cités ci-dessus, indiquant que l'adjonction de fortes doses de BAP dans le milieu provoque, sur des rejets prélevés in vivo, une prolifération importante des plantes, et d'observations personnelles qui nous ont permis de nous rendre compte, que l'AIA favorise une meilleure croissance des plantes ainsi formées.

Les cultures sont placées, comme précédemment, 15 jours à l'obscurité, puis, à la lumière. Les plantes apparues sont isolées des explants 40 jours après leur mise en culture. Le comptage du nombre de plantes issues à partir de chaque explant est relevé, compte tenu de données déjà acquises, seulement lors du deuxième repiquage après l'isolement.

Les principaux résultats sont consignés dans les tableaux III et IV.

. Un premier essai nous a permis de nous rendre compte que la coupure verticale de la plante accroît, de façon très hautement significative, le nombre de pousses obtenues par plante-mère, dans nos conditions d'expérience. Cependant, vu la faiblesse de notre effectif dans ce premier essai, nous n'avons pas pu montrer l'influence du milieu, ni l'existence ou non d'une interaction entre le milieu et la coupure (Tableau III).

. Avec l'utilisation d'un nombre plus grand d'individus dans un 2ème essai, l'action du milieu sur le taux de multiplication a pu être précisée. A l'issue du traitement, le nombre de plantes apparues sur chaque explant est de $A_{5B_{7,5}}$ en moyenne par aisselle (soit 19 environ par plante-mère) sur le milieu alors qu'il n'est que de 1,25 par explant (soit 5 environ par plante-mère) sur

Tableau III: Effet de la coupure et du milieu sur l'explant.
Le tableau donne le nombre de pousses par explant.

A : Résultats

Sans coupure		Avec coupure	
MS _b	MS _{A5B7,5}	MS _b	MS _{A5B7,5}
1	1	4	8
1	1	7	26
1	1	8	23

B : Analyse de variance

Source de variations	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F
traitement coupure	323,25	1	323,25	13,46 (**)
milieu	107,25	1	107,25	4,46
trait. coupure x milieu	189,75	1	189,75	7,90 (*)
résiduelle	192,00	8	24,00	
totale	812,25	11	73,40	
(*) F significatif au seuil 0,05 (**) F significatif au seuil 0,01				

Tableau IV : Effet du milieu (MS_b ou MS_{A5B7,5}) sur l'apparition de nouvelles pousses à partir de 1/4 d'apex (après coupure).

Le tableau donne le nombre de pousses par explant.

Milieu	MS _b	MS _{A5B7,5}
	1	2
	1	2
	1	2
	1	2
	1	6
	1	7
	4	6
	2	7
	1	12
	1	1
	0	7
	1	3
Moyenne :	1,25	4,75

La différence entre les deux moyennes est significative au seuil 0,001.

le milieu MSb. La différence entre le nombre de plantes obtenues sur ces deux milieux est très hautement significative (Tableau IV).

. Nous avons remarqué, par ailleurs que les plantes se développent uniquement à partir du sommet de l'explant sur MSb (Pl. I₄) alors que sur MS_{A5B7,5} elles apparaissent à la base, au niveau de l'insertion des feuilles (ce qui a lieu plus tardivement).

1-2-2 : Etude histologique de l'ontogenèse des plantes produites.

Cette étude a été faite dans les conditions de culture qui permettaient d'obtenir le taux de multiplication le plus fort, c'est à dire, comme nous venons de le voir, sur des ^{1/4} de plantes cultivés in vitro du cv. "Américani", déposés sur le milieu MS_{A5B7,5} et placés de façon identique à ce que nous avons déjà décrit. Les explants sont prélevés lors de la mise en culture puis, tous les trois jours environ.

. L'observation de coupes longitudinales de tiges vraies entières de bananier in vitro, montre que le méristème terminal est arrondi et qu'on ne trouve jamais de bourgeons à l'aisselle des feuilles (Pl. I₅).

. Nous avons remarqué, sur les explants prélevés lors de la mise en culture et qui jouent, donc, le rôle de témoins, que l'incision de la tige passe rarement par le centre du méristème terminal et que, souvent, un seul explant sur les quatre porte le méristème terminal presque dans sa totalité, les trois autres ne contenant que des tissus de tige avec, à leur sommet, une toute petite portion tangentielle du massif méristématique, cette dernière étant d'ailleurs d'autant plus importante que l'incision passe plus près du centre de la tige.

. Après 6 à 12 jours de culture, nous constatons une reprise de la croissance du méristème terminal dans le cas où celui-ci est resté presque entier (Pl.II₃), la réorganisation puis la croissance du méristème, dans le cas où la coupure passe franchement par lui (Pl.II₂), ou bien la néoformation directe (c'est à dire sans passage par cal visible à l'oeil nu) d'un nouveau méristème caulinaires à partir de tissus du sommet de la tige lorsque dans ces tissus, il n'y a pratiquement plus de cellules appartenant au méristème apical (Pl.II₁).

. 15 à 20 jours plus tard, les méristèmes ainsi constitués se divisent en deux pour donner deux nouveaux méristèmes qui, à leur tour, peuvent encore se diviser et ainsi de suite (Pl.III₁).

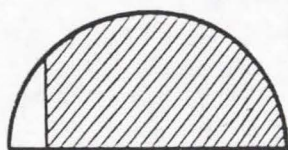
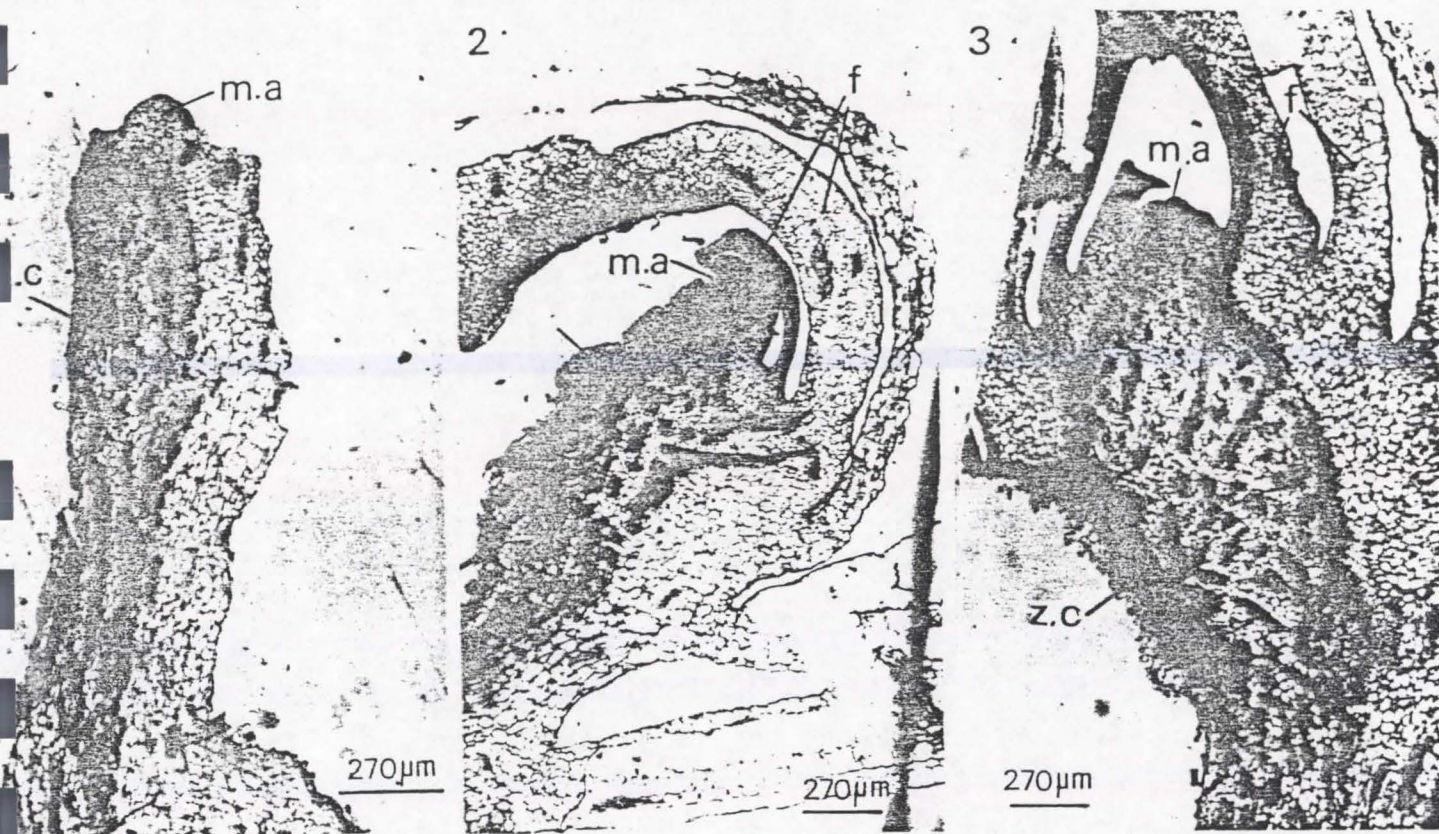
. Nous avons également observé sur des coupes longitudinales, l'apparition plus tardive, au niveau des tissus de la base de l'explant (qui ne sont pas nécrosés), la néoformation directe

de méristèmes caulinaires, précédée, semble-t-il, d'une hypertrophie limitée des tissus qui leur ont donné naissance (Pl.III₂).

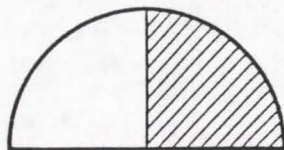
1-3 : Conclusions et discussion.

1-3-1 : Les principales étapes de l'ontogenèse des nouvelles plantes produites lors de la multiplication végétative de bananiers déjà cultivés in vitro.

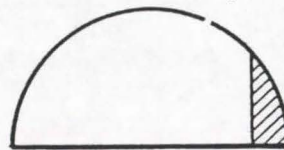
L'étude histologique effectuée au cours du temps, sur le devenir de fragments de tiges de bananiers déjà cultivés in vitro, nous a permis de distinguer plusieurs étapes successives dans l'ontogenèse des nouveaux méristèmes végétatifs obtenus :



1



2



3

Planche II: Multiplication végétative accélérée à partir de plantes cultivées in vitro.

Représentation schématique des sections longitudinales pratiquées dans les méristèmes apicaux de tiges et photographies des différentes modalités d'organogénèse obtenues à partir de ces fragments d'apex après 10-15 jours de culture.

En 1-2-3: Différentes sections pratiquées dans le méristème terminal de la tige; la partie hachurée correspond à la portion du méristème qui a été supprimée.

m.a.: méristème apical; f.: feuille; z.c.: zone cicatricielle.

- La première consiste en la mise en place, sur les explants, d'un méristème caulinaire. Celui-ci, dont la genèse peut être différente, se situe toujours au sommet du fragment de tige et correspond :

soit à une simple reprise d'activité du méristème déjà présent dans sa totalité,

soit en une restructuration plus ou moins profonde des tissus méristématiques originels restants,

soit quand ces derniers sont pratiquement inexistants, en une néoformation directe d'un méristème à partir des tissus du sommet de la tige.

- Dans une deuxième étape, les méristèmes ainsi constitués, se divisent plusieurs fois, ce qui, macroscopiquement, se traduit par la production de petites plantes accolées les unes aux autres, en forme de "bouquet". Ces bipartitions de méristèmes qui n'ont rien à voir avec des ramifications, ne sont pas sans rappeler les travaux de LOISEAU (1954) sur la fasciation provoquée de méristèmes caulinaires, celle-ci étant décrite comme un phénomène progressif et, surtout, automaintenu, ce qui est bien le cas avec notre matériel, du moins pendant un certain temps. Par ailleurs, nous sommes tentés de rapprocher ces observations de celles qui ont été faites au champ par de nombreux auteurs (CHAMPION, 1967). Ceux-ci ont, en effet, constaté fréquemment des cas de dichotomie (ou plus) de l'inflorescence et parfois du méristème végétatif. Les méristèmes de bananiers présenteraient-ils des tendances à la fasciation spontanée lorsqu'ils sont amenés à se développer rapidement, c'est à dire, au moment de la sortie de l'inflorescence ou bien dans les conditions de culture in vitro après fragmentation ? La question reste posée.

- Enfin, plus tardivement, dans une 3ème étape, nous avons observé, et indépendamment de ce qui vient d'être décrit au sommet de l'explant, la néoformation directe de nombreux méristèmes à la base de l'explant, à partir de tissus de la tige qui ne se sont pas nécrosés et qui sont localisés

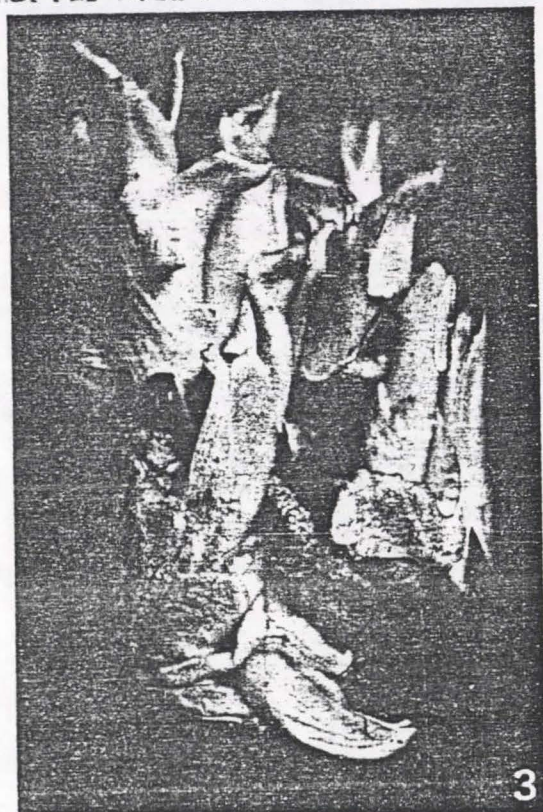
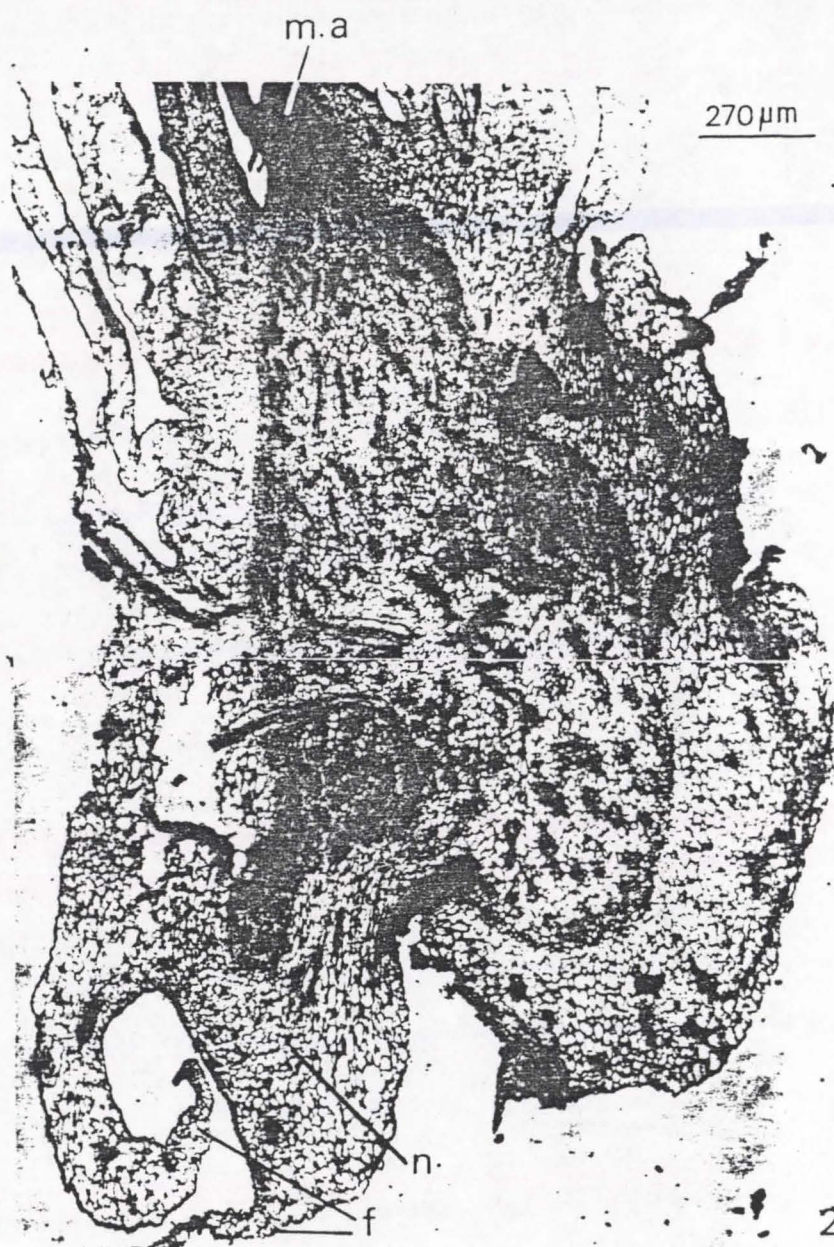


Planche III: Multiplication végétative accélérée à partir de plantes cultivées in vitro (suite).

1: Divisions successives du méristème apical (coupe longitudinale d'explants). 2: Apparition de néoformations à la base du corme. 3: multiplication activée à partir d'explants placés sur un milieu $MS_b + AIA(1 \text{ mg/l}) + BAP(10 \text{ mg/l})$.
 m.a.: méristème apical; n.: néoformation; f.: feuille.

vraisemblablement au niveau des aisselles foliaires les plus âgées. Ces méristèmes sont, eux aussi, capables de se diviser comme ceux du sommet.

Les résultats apportés par l'analyse histologique confirment et précisent les observations que nous avons pu faire à l'oeil nu sur ce même matériel : apparition précoce de pousses au sommet de la tige, puis développement plus tardif de nombreuses autres pousses à la base de l'explant.

1-3-2 : Comparaison des résultats obtenus lors de la multiplication végétative en fonction de l'origine du matériel (in vivo ou in vitro)

La comparaison de l'apparition et du développement des plantes obtenues à partir de tiges provenant de rejets in vivo, ou de plantes cultivées in vitro, montre que, dans les conditions où nous avons opéré, il existe une différence essentielle.

- En effet, dans le premier cas, on n'a constaté la formation de nouvelles plantes qu'à la base de l'explant et jamais au sommet. Or il est aussi possible avec ce type d'explant, mais en utilisant des fortes doses de BAP (10 mg/l), d'obtenir la formation de nouvelles pousses à partir des tissus du sommet (TEISSON, communication verbale). Si nous n'avons pas observé ce résultat sur les explants de rejets mis en culture, cela provient très vraisemblablement de la concentration trop faible (1 mg/l) de BAP que nous avons employée.

Quoiqu'il en soit, à partir de la base des explants de tige, qu'ils proviennent de matériel prélevé in vivo ou in vitro, nous avons, par conséquent toujours noté le développement de plusieurs pousses qui paraissent être initiées au niveau des aisselles foliaires les plus âgées.

Certains auteurs (tels que SWAMY et coll., 1982/83) attribuent la formation de ces nouvelles pousses au développement de bourgeons axillaires préexistants. A notre avis, cette interprétation des faits n'est pas exacte. En effet, sur des apex de tiges entiers non fragmentés, l'étude anatomique montre qu'il n'y a pas de bourgeons à l'aisselle des feuilles. Ce résultat a été signalé par BARKER et coll. (1962) pour le matériel in vivo : ces auteurs ont, en effet, indiqué l'absence de bourgeons axillaires à la base des neuf premières feuilles situées sous le méristème apical du rejet, ce qui correspond justement à la portion de rejet sur laquelle nous avons travaillé. Des observations personnelles permettent aussi d'affirmer que les aisselles foliaires des apex de plantes cultivées in vitro n'abritent pas, non plus, de bourgeons axillaires.

Il semble donc que, en particulier, par fragmentation de ces apex, on ait réussi à provoquer dans les tissus situés à l'aisselle des feuilles les plus âgées, la néoformation directe de méristèmes végétatifs disposés en position collatérale, comme cela se produit généralement chez les Monocotylédones.

Nous avons constaté également sur les deux types d'explants que, après l'isolement des nouvelles pousses formées, il pouvait en apparaître quelques unes encore lors du 1er repiquage et jamais plus au cours des repiquages ultérieurs. On peut penser que ces plantes qui ont été notées lors du premier repiquage correspondent plutôt à des bourgeons néoformés préexistants au 1er repiquage et qui auraient été prélevés dans certains cas en même temps que les pousses que l'on cherchait à isoler. Nous ne pensons pas qu'il s'agisse de néoformations directes de bourgeons qui auraient eu lieu à la base des nouvelles pousses après le 1er repiquage. Aussi, une fois ^{que} toutes les plantes ont été

isolées, il n'est plus possible d'en accroître le nombre au cours des repiquages successifs à moins, bien entendu, que l'on fragmente à nouveau ces plantes.

1-3-3 : Conditions permettant l'apparition et le développement de nouvelles pousses.

Les résultats, présentés dans le tableau III, montrent clairement qu'il est nécessaire de sectionner les tiges verticalement pour que l'on obtienne la production de nouvelles plantes de bananiers. Il est vraisemblable que la coupure provoque un déséquilibre au sein de l'explant, entraînant momentanément une sensibilité accrue des tissus aux traumatismes pratiqués. Par ailleurs, comme le montre le tableau IV, si la présence d'AIA et de BAP n'est pas indispensable pour la réorganisation ou la néoformation de méristèmes, elle favorise tout de même nettement le développement d'un nombre plus important de plantes.

Sur ce milieu, les observations morphologiques et les études cytologiques des explants ont montré une hypertrophie de la base du corme, ce qui ne se produit jamais sur le milieu MSb témoin. Par ailleurs, il nous a semblé que la fasciation continue des méristèmes est plus importante sur le milieu MS_{A5B7,5} que sur le milieu MS_b.

. On peut mentionner aussi, qu'à l'inverse de ce qui a été indiqué dans d'autres travaux (SWAMY et coll., 1982/83; MANTE et coll., 1983) mais en accord avec les données de CRONAUER et KRIKORIAN (1984) qui ont utilisé des milieux proches des nôtres, il n'est pas nécessaire de rajouter des auxines (AIA, ANA, ou AIB) dans le milieu pour que les plantes isolées de rejets s'enracinent. Le bananier in vitro, dans nos conditions de culture, ne pose pas de problèmes d'enracinement.

Enfin, la production in vitro de nouvelles pousses dépend aussi du génotype de bananier utilisé : plus de plantes sont produites à partir du cv. "Américani" qu'à partir du cv. "French Plantain". Ces résultats sont, d'ailleurs, à relier avec ce que l'on sait du comportement respectif de ces deux cultivars au champ. Les plantains en général forment beaucoup moins de rejets que les bananiers de la série "Cavendish" (DE LANGHE, 1983). L'adjonction au milieu de quantités plus importantes de BAP avec les plantains pourrait peut être permettre de pallier ce désavantage.

1-3-4 : Quelques informations concernant la conformité et l'homogénéité de nouvelles pousses obtenues.

L'étude de la production active de nouvelles pousses, à partir de rejets prélevés in vivo et de plantes in vitro, nous autorise à penser que nous nous situons bien dans le cadre d'une multiplication conforme attendu que nous n'avons pas décelé, dans nos conditions d'expérience, de remaniements importants des tissus précédant l'apparition des nouvelles plantes. Néanmoins, il reste essentiel d'émettre des réserves, car, si dans certains cas, nous assistons à une simple reprise d'activité ou une simple réorganisation et croissance des méristèmes déjà présents, dans d'autres, nous sommes face à de véritables processus de néoformation. Or, cette dernière forme d'organogenèse pourrait, à l'inverse de la précédente, ne pas être conservatrice du patrimoine héréditaire ou de son fonctionnement et, bien que l'on n'observe pas de prolifération anarchique, entraîner l'apparition de plantes différentes. Nous n'avons pas, pour le moment, décelé in vitro, de différences phénotypiques entre les bananiers issus d'un même parent, à la suite d'une phase de multiplication accélérée.

Cependant, seule une observation minutieuse de ces plantes au champ , au stade végétatif et floral nous permettra de savoir si ce mode de multiplication est toujours conforme. Nous tenons à signaler à ce sujet, qu'une communication faite lors de la réunion du CARIBBEAN FOOD CROP SOCIETY (CFCS) à PUERTO RICO indique que la multiplication in vitro de plantains du cv. " Batard" (sans que la méthode exacte utilisée soit précisée mais vraisemblablement très proche de la nôtre, avec des rejets prélevés in vivo), donne 27 % d'individus du type du cv. "Cortie", ces deux clones, dans la nature, étant jugés par ailleurs très proches l'un de l'autre (TEZENAS DU MONTCEL, communication personnelle). Ainsi, la multiplication accélérée in vitro demanderait peut être à être nuancée, afin de pouvoir maintenir la conformité des plantes.

En tous cas, les plantes que nous obtenons après plusieurs repiquages en culture in vitro sont miniaturisées : en particulier les cellules des faisceaux libéro-ligneux du limbe ont une taille réduite de moitié environ (Pl.VII.1) par rapport à la taille des cellules des faisceaux du limbe des plantes in vivo. Ces plantes présentent aussi, dans ces conditions de culture, certaines caractéristiques observées chez les jeunes individus issus de la germination de la graine. En effet, nous avons déjà indiqué que, in vitro, les gaines foliaires n'étaient pas étroitement accolées et que les nervures du limbe étaient toutes parallèles. Or, comme l'a montré SKUTCH (1930), la première feuille de la jeune plante issue de graine présente des nervures toutes parallèles, puis, sur les feuilles qui apparaissent ultérieurement, les nervures secondaires deviennent progressivement de plus en plus obliques par rapport à la nervure centrale du limbe pour devenir finalement perpendiculaires à celle-ci dans les feuilles adultes.

Des structures rajeunies ont été observées à l'heure actuelle à partir de la culture in vitro de bon nombre de plantes. Les conditions écologiques, tout à fait particulières dans lesquelles sont placées les plantes, amènent une miniaturisation des méristèmes qui vont se développer en tiges et qui fonctionneront, de ce fait, en présentant certains caractères du mode juvénile (NOZERAN et coll. 1982).

L'intérêt de ce rajeunissement obtenu en culture in vitro, et qui, une fois qu'il est pleinement installé, se maintient au cours des repiquages successifs, est de permettre l'obtention de plantes relativement homogènes puisque ramenées, par ce mode de culture, à un état physiologique comparable.

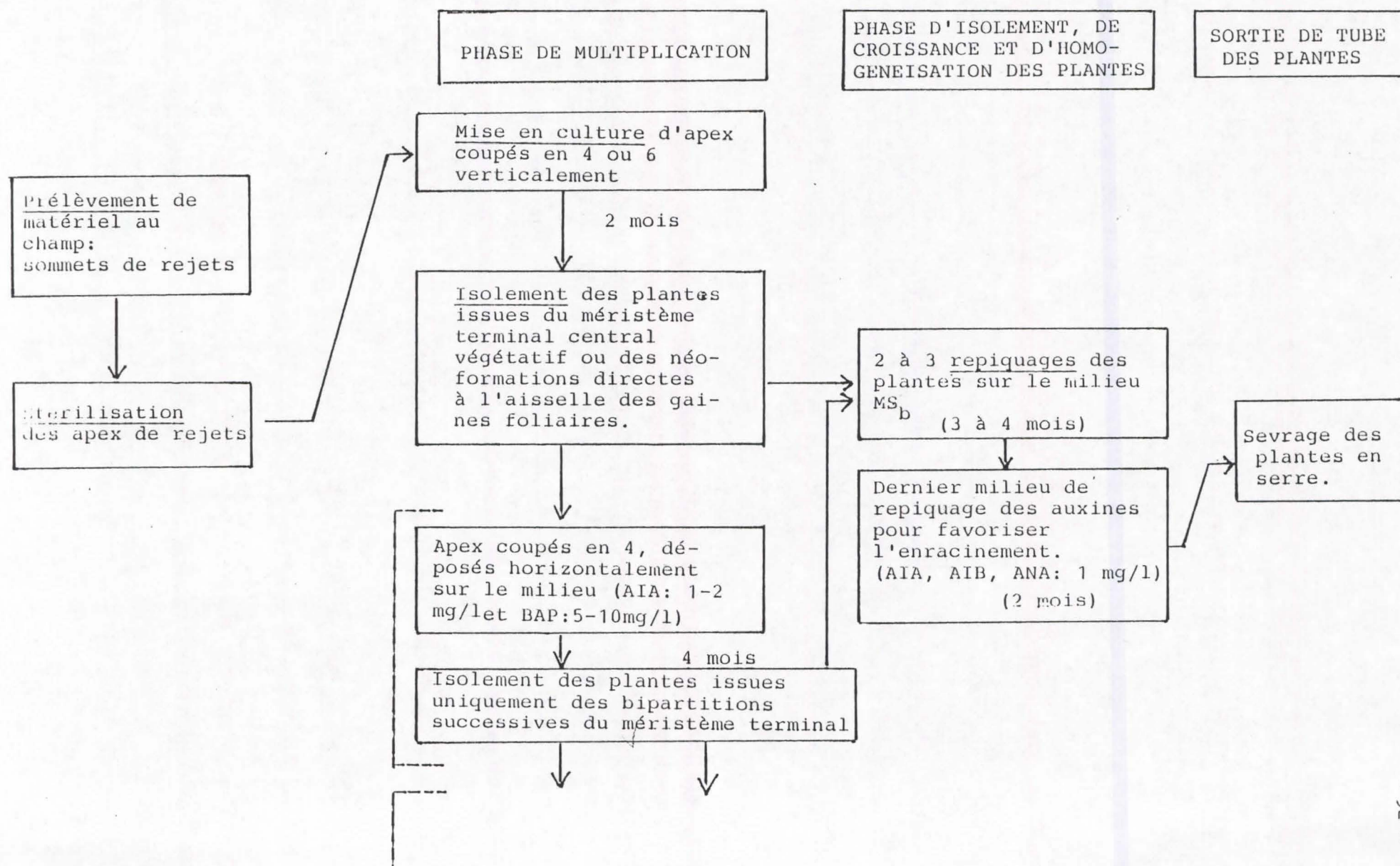
1-3-5 : Proposition d'une méthode de multiplication végétative accélérée et conforme du bananier in vitro.

Par un affinement des techniques que nous avons employées (modifications en particulier du positionnement des explants sur le milieu de culture et de la concentration de ce dernier en régulateurs de croissance), il est possible d'obtenir un taux de multiplication supérieur à celui indiqué dans nos travaux et qui est de l'ordre de 10 à 15 plantes par explant (Pl.III₃)

Mais comme nous l'avons déjà indiqué, nous avons choisi d'utiliser ce mode de multiplication végétative, non pas pour en améliorer le rendement, mais afin d'analyser avec précision l'origine des plantes obtenues après section des apex de tiges.

Néanmoins nous pouvons, compte-tenu des résultats déjà obtenus par nous ou d'autres chercheurs dans ce domaine, proposer une méthode de multiplication in vitro du bananier. Celle-ci est résumée dans le tableau V.

Tableau V: Les différentes étapes d'une multiplication végétative in vitro accélérée et conforme du bananier.



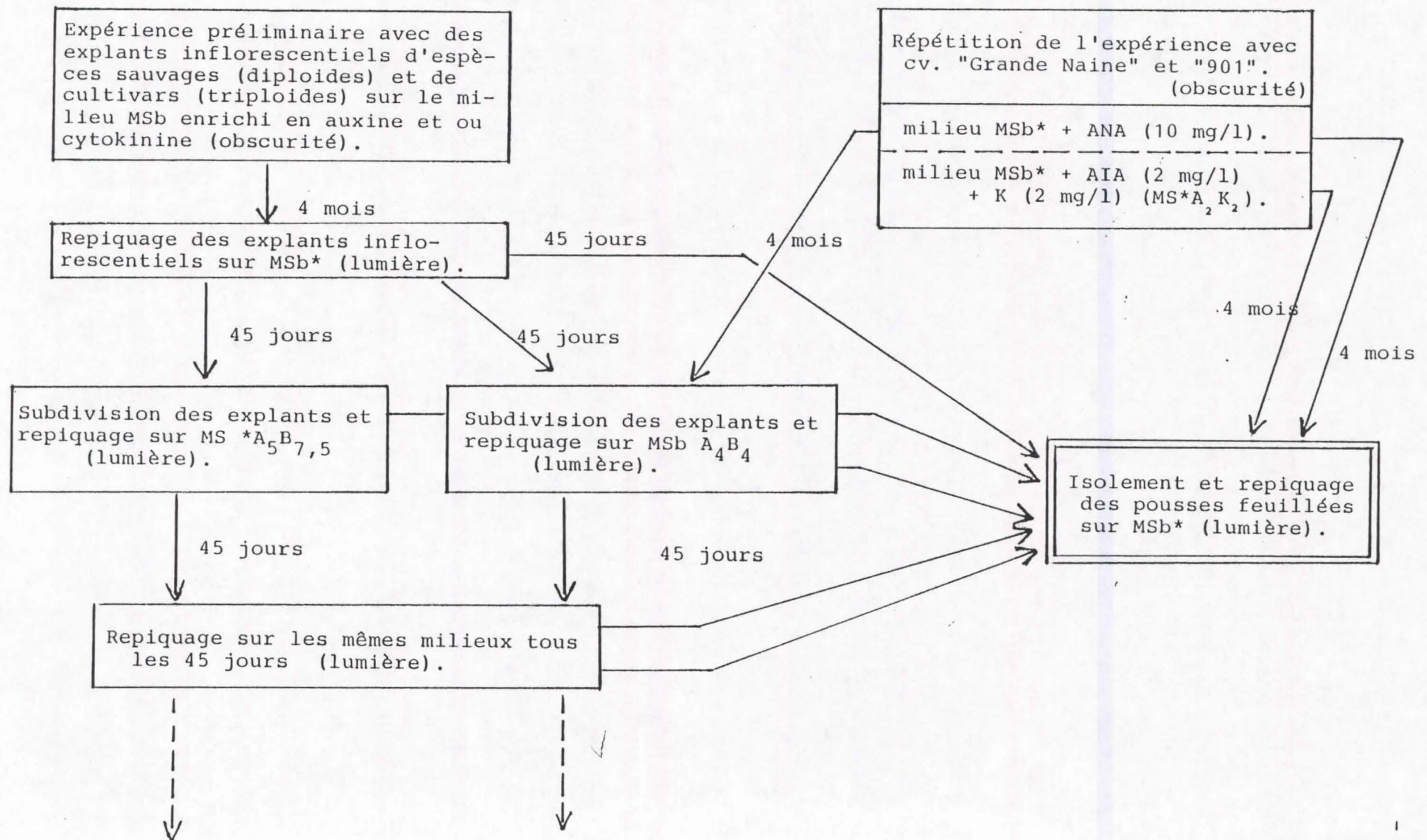
En partant d'un seul rejet, et en répétant la phase de multiplication tous les 4 mois, intervalle de temps nécessaire pour que le méristème et la tige de la plante ~~grossissent~~ suffisamment pour être sectionnés, 8.000 plantes par an pourraient être produites alors que, par les méthodes de forçage traditionnelles au champ (BARKER, 1959), le taux de multiplication est au maximum de 420 plants par rejet et par an. Si la technique de multiplication in vitro, qui est relativement couteuse, n'autorise peut-être pas la production directe des plantes, elle pourrait être utilisée seulement lors des premiers cycles, pour la propagation rapide d'une structure génétique intéressante.

2°) A partir d'apex inflorescentiels.

2-1 : Apparition de pousses feuillées.

Afin de faciliter la compréhension des différents travaux réalisés sur les apex inflorescentiels, ces derniers étant coupés verticalement en 4 fragments comme les rejets, un schéma, qui en récapitule l'ensemble, est donné dans la figure 8. Sur de tels explants, au moment de leur mise en culture (Fig.9 B), la taille des fleurs les plus grandes (F) et de leurs ovaires sont respectivement de 5 mm et 2 mm de haut. Les fleurs, à mesure que l'on se rapproche du méristème terminal de l'épi, sont de plus en plus petites pour être réduites à de simples boutons floraux (bF) et, enfin, inexistantes au sommet de l'inflorescence.

Fig 8 : Schéma général des travaux de caulogénèse effectués sur les inflorescences en phase mâle de bananiers.



2-1-1 : Expérience préliminaire.

2-1-1_r : Réactions des explants primaires.

Après 4 mois environ de culture à l'obscurité, les explants inflorescentiels ont manifesté diverses réactions qui, pour une grande part, dépendent du type ou de la combinaison en régulateurs de croissance employés.

Les résultats obtenus à l'issue des implantations primaires, et qui sont résumés dans le tableau VI, sont les suivants :

. Sur le milieu témoin (MSb sans auxines, ni cytokinines) ainsi que sur MSb + BAP (1 mg/l), l'ensemble des tissus de l'explant noircit, se nécrose puis meurt à l'exception du méristème terminal de l'inflorescence. Dans quelques rares cas, ce méristème a même continué son développement en réversant vers un fonctionnement végétatif, ce qui se traduit par l'apparition d'une pousse feuillée qui peut se diviser, par la suite, à son sommet (Pl.IV-1 et fig. 9 B(a)).

. Sur les milieux MSb + auxines seules, les tissus de la zone cicatricielle de l'explant noircissent, mais ceux qui sont plus internes, et ceux qui se situent à l'aisselle des bractées restent vivants. Tous les tissus floraux proprement dits, manifestent des réactions qui dépendent de leur état de différenciation. Elles se traduisent en général, pour les fleurs déjà développées par une hypertrophie des ovaires (Pl.IV-2), mais on n'observe pas, dans ce cas, de grandes modifications des autres pièces florales (périclanthe, anthère et stigmate). Au niveau des aisselles plus jeunes où aucune fleur n'est encore ébauchée, on note un simple gonflement des tissus. Toutes les réactions sont d'autant plus accusées que les parties de l'explant concernées, sont au contact du milieu.

Tableau VI : Réactions des explants inflorescentiels primaires
observées après 4 mois de culture.

réaction de l'explant milieux	Etat général de l'explant	Apparition de plantes portées par l'axe de l'inflorescence		
		base de l'inflorescence l'inflorescence: fleurs complètement développées	sommet de l' apex.	réversion du méristème terminal
MS _b (témoin) MS _b + BAP (1mg/l)	.faible noircissement du milieu .nécrose général et mort des tissus à l'exception du méristème de l'inflorescence	aucune	aucune	quelques cas de réversions vers un fonctionnement végétatif
MS _b + auxines seules ANA (1et10mg/l) ou 2,4D (1mg/l)	.fort noircissement du milieu .hypertrophie des ovaires au contact du milieu .gonflement des tissus à l' aisselle des bractées. .développement de racines sur l'axe inflorescentiel ANA (10mg/l) , 2,4D (1mg/l)	.néoformation à côté de la base d'une fleur	aucune	oui
MS _b + auxines+ cytokinines -ANA (1mg/l) + BAP (0,5et1mg/l) -AIA (2mg/l) + K (2mg/l)	.fort noircissement du milieu .développement anormal de tous les tissus floraux surtout au contact du milieu .gonflement des tissus à l' aisselle des bractées ANA (1mg/l) +BAP (0,5et1mg/l) .pas de racines	.fleurs jeunes: réversion du méristème floral vers un fonctionnement végétatif .fleurs âgées: néoformation d'un méristème végétatif à côté de la base des fleurs âgées	.développement de pousses feuillées à l'aisselle des bractées MS _b +AIA (2mg/l) +K (2mg/l)	oui

Par ailleurs, sur ces mêmes milieux, nous avons souvent observé une rhizogenèse,abondante directement issue de l'axe inflorescentiel surtout sur les milieux avec ANA(à 10 mg/l)ou 2,4 D(à 1 mg/l)(Pl.IV.3).

. L'emploi de milieux renfermant à la fois des auxines et des cytokinines (BAPou K)ne modifie pas fondamentalement la réaction des tissus par rapport à celle que nous venons d'observer avec les auxines seules. On note cependant, outre le gonflement des ovaires, une morphogenèse aberrante des autres parties de la fleur (étamines, tépales ...) qui peuvent, par exemple, atteindre des tailles gigantesques (Pl.IV-4 et 5), mais aucune initiation de racines n'a été constatée.

Une partie des explants cultivés sur ces milieux,contenant des auxines et/ou des cytokinines, portent des pousses végétatives dont le lieu d'initiation est très variable . Certaines se sont développées, comme nous l'avons déjà vu précédemment, à partir du méristème terminal de l'inflorescence, mais aussi,directement au niveau de tissus, situés à côté des fleurs développées (Pl.IV-6 et fig.9 .B(d))et parfois au sommet de fleurs à peine ébauchées (fig. 9.B(c)).

2-1-1₂ : Réactions des explants au cours des repiquages.

Tous les explants primaires, quelle que soit leur origine, et dont les tissus n'étaient pas morts au bout de 4 mois de culture, sont repiqués sur le milieu MSb^{*} et placés à la lumière (Fig.8). Dans ces conditions, les tissus les plus jeunes de l'inflorescence verdissent mais aucune nouvelle plante n'est apparue,seules,celles qui étaient déjà initiées,ont continué à croître.

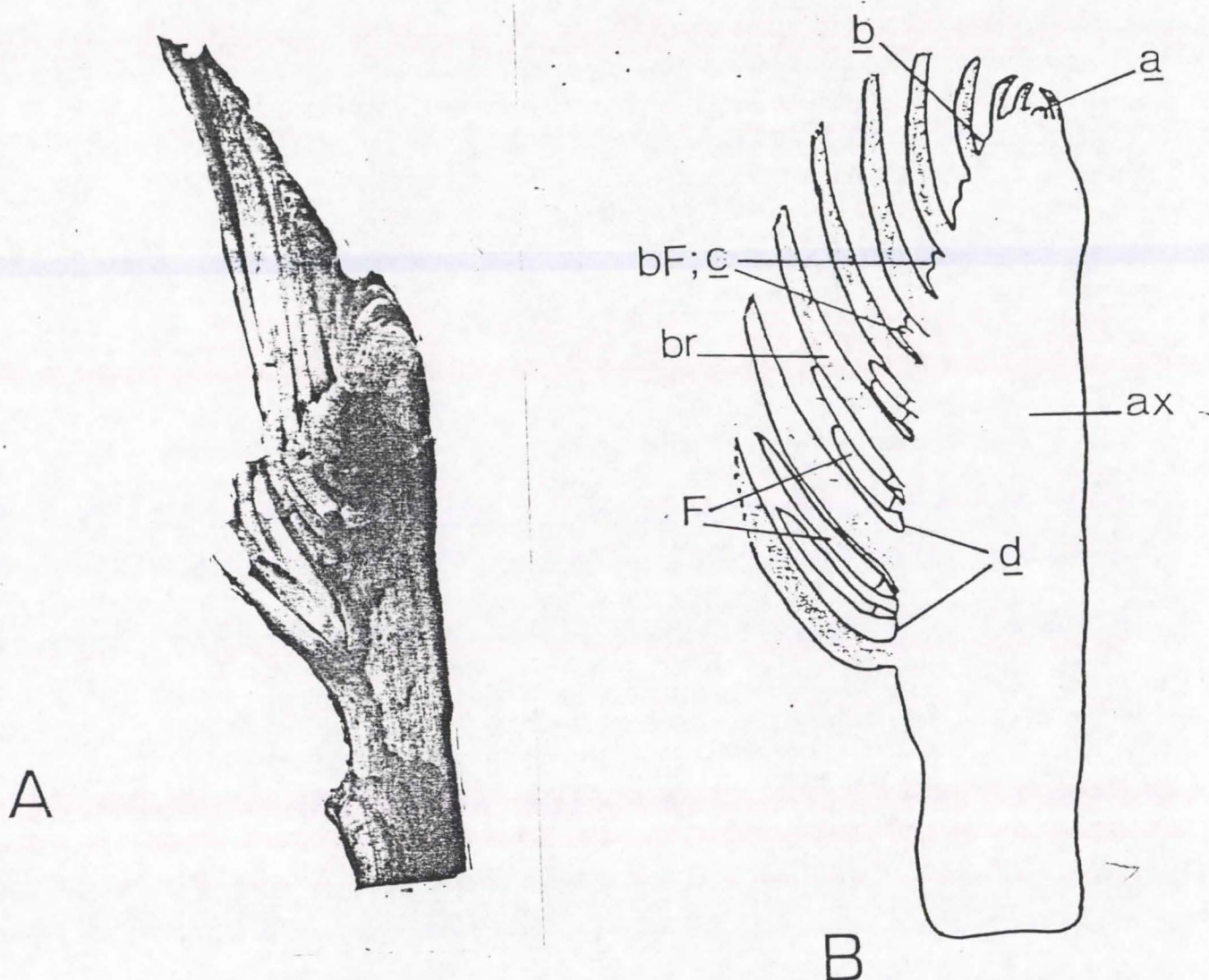


Fig. 9 : Un explant inflorescentiel et son devenir en culture in vitro.

- A : Photographie d'un explant inflorescentiel au moment de l'implantation.
- B : Schéma floral résumant les différentes modalités d'apparition de pousses feuillées sur les explants inflorescentiels.
- a : réversion du méristème terminal de l'inflorescence.
 - b : néoformation directe à l'aisselle des bractées les plus jeunes.
 - c : réversion des boutons floraux.
 - d : néoformation insérée sur l'axe inflorescentiel à côté de la base des fleurs développées.
- ax : axe inflorescentiel; br : bractée; bF : bouton floral; F : fleur mâle développée.

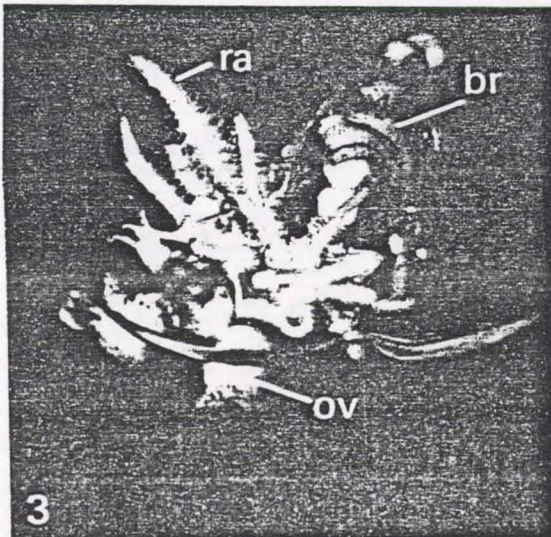
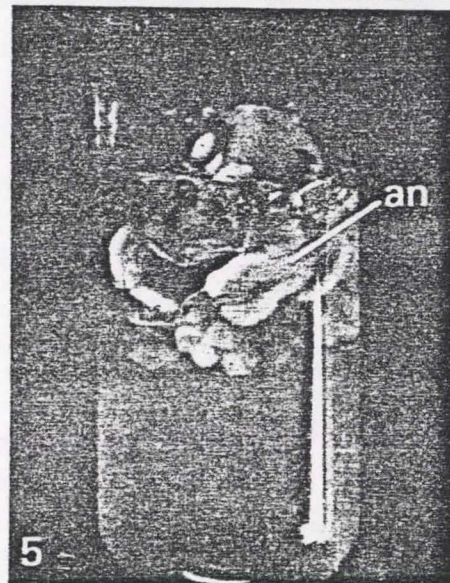
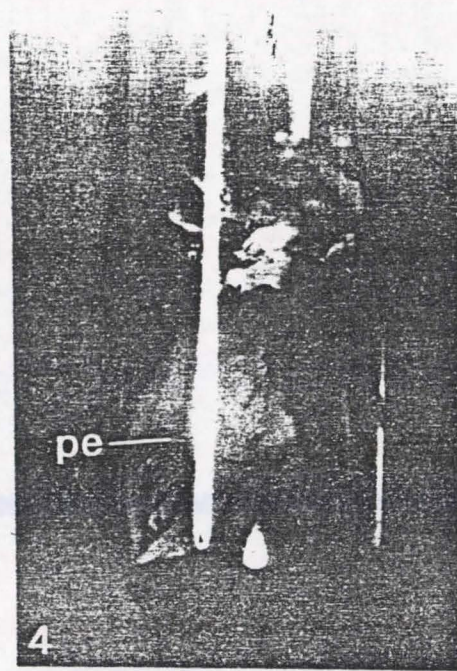
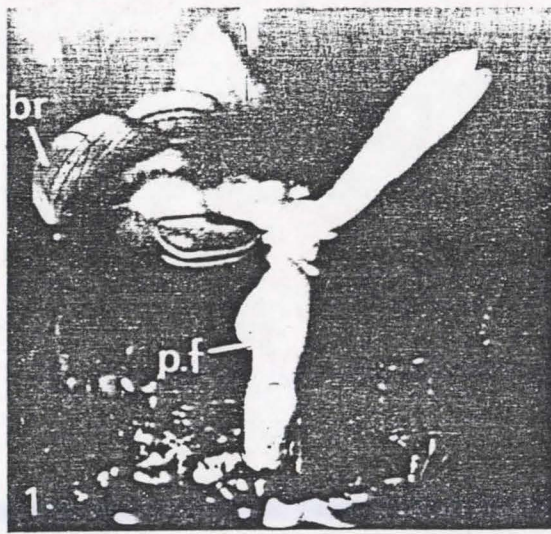


Planche IV: Réaction des explants inflorescentiels mis en culture sur divers milieux (à l'obscurité).

1: Réversion du méristème terminal de l'épi qui s'est de plus divisé ($MS^* + BAP$ à 1 mg/l); 2: Hypertrophie des ovaires au contact du milieu ($MS^* + ANA$ à 10 mg/l); 3: Développement de racines sur l'axe inflorescentiel ($MS^* + ANA$ à 10 mg/l); 4-5: Morphogénèses aberrantes présentées par des tissus floraux ($MS^* + ANA$ et BAP à 1 mg/l); 6: Développement de pousses végétatives ($MS^* + ANA$ à 1 mg/l).

an.: anthère ; br.: bractée; pe.: périanthe; p.f.: pousse feuillée; ra.: racine; ov.: ovaire.

Au bout de 45 jours de culture sur ce nouveau milieu, les pousses végétatives sont isolées, repiquées sur le milieu MSb* et tous les explants après avoir été divisés, sont repiqués pro.parte sur le milieu MS^{*}A₄B₄ (MSb* + AIA (4 mg/l) + BAP (4 mg/l)) et pro.parte sur le milieu MS^{*}A₅B_{7,5} (MSb* + AIA (5 mg/l) + BAP (7,5 mg/l))(Fig. 8).

Au bout de 1 à 3 mois de culture selon les génotypes, il apparaît de nouvelles plantes sur tous les explants, ceux-ci étant repiqués régulièrement tous les 45 jours sur les deux milieux cités ci-dessus. Ces plantes prennent naissance de toutes les manières déjà décrites, mais aussi à l'aisselle des bractées les plus jeunes qui ne portent pas encore de fleurs (Fig. 9 B(b)). Toutefois, le milieu MS^{*}A₅B_{7,5} qui entraîne un noircissement plus poussé des tissus, en particulier des fleurs, semble donner de moins bons résultats que le milieu MS^{*}A₄B₄.

Les résultats que nous venons d'exposer, ont été obtenus avec du matériel végétal divers du point de vue génétique (sur des espèces sauvages séminifères et des cultivars triploïdes). L'intensité de l'initiation des nouvelles plantes, néanmoins, varie selon le génotype : elle a été relativement peu élevée sur les Plantains (cv. "Ekona") (10 à 15 plantes par explant.), et beaucoup plus importante avec M.acuminata zabrina et les bananiers de la série "Cavendish" (cv. "Grande Naine", "901") (40 à 70 plantes par explant).

2-1-2 : Répétition de l'expérience.

Toutes les données que nous avons acquises assez fortuitement dans un premier temps, ont pu être ensuite répétées. Pour cela, des explants prélevés au sommet de plusieurs inflorescences du cv. "Grande Naine" et "901" ont été mises en culture à l'obscurité selon la méthode déjà décrite pour

les parties supérieures mais aussi, en tranche de 5 mm d'épaisseur pour les parties inférieures, sur les nouveaux milieux. L'un MSb* + ANA (10 mg/l), l'autre MS* A₂ K₂ MSb* + AIA (2 mg/l) et de la K (2 mg/l) (combinaison de régulateurs de croissance déjà utilisée par d'autres auteurs (MA et SHII, 1978)).

Au bout de 4 mois de culture, les explants ont manifesté les mêmes réactions que celles que nous avons déjà observées. Pour le repiquage des explants issus de MSb* + ANA seulement, il est nécessaire d'utiliser le milieu MS* A₄B₄, afin d'obtenir une initiation importante de pousses végétatives. Par contre, il n'est pas utile de changer de milieu au repiquage, lorsque les explants sont mis en culture sur MSb* + AIA et K puisque, sur ce milieu, les pousses végétatives apparaissent en nombre suffisant, au bout de 3 à 4 mois de culture.

2-2 : Morphologie des pousses feuillées.

La forme des premières feuilles produites par ces pousses dépend de leur lieu d'initiation sur l'explant inflorescentiel (Fig. 9 A et B).

Ainsi, pour les plantes provenant de la réversion du méristème terminal de l'épi, les feuilles sont étroites, allongées et à nervures parallèles rappelant par ce dernier caractère la 1^{ère} feuille de la jeune plante issue de la germination de la graine (Pl. IV-1 et Fig. 9-B(a)). Les plantes, apparaissant au sommet des jeunes boutons floraux, sont de morphologies diverses : certaines présentent d'abord des feuilles arrondies, imbriquées, en forme de cuillère ressemblant à des pièces florales, puis on assiste à un déboitement des feuilles qui s'arrête lorsque celles-ci ont progressivement acquis des formes de jeunesse (comme il a été cité ci-dessus) (Fig. 9 B(c) et Pl. V.1). D'autres montrent des feuilles, d'emblée à caractéristiques juvéniles avec des noeuds très apparents à l'aisselle desquels une racine peut se développer.

Par ailleurs, les feuilles des plantes néoformées directement à partir de tissus situés à l'aisselle des bractées de l'explant (Fig. 9 B(b) et (d)), sont d'abord en forme^{de} petites écailles, puis très vite, prennent une morphologie de jeune plante in vitro (Pl.V 2, 3 et 4).

Il est possible de trouver, selon le stade de différenciation des fleurs au moment de la mise en culture de l'explant, toute une série de structures morphologiques intermédiaires et situées entre celles que nous venons de décrire.

Enfin, il est intéressant de noter que toutes ces plantes prennent des caractères de jeunesse, ces derniers étant plus ou moins marqués selon le lieu de la naissance.

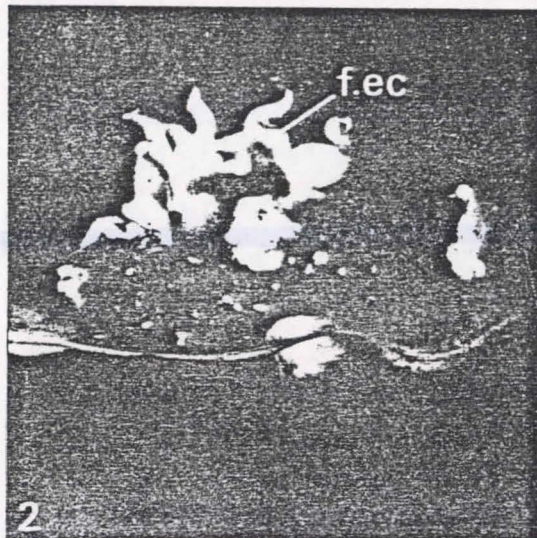
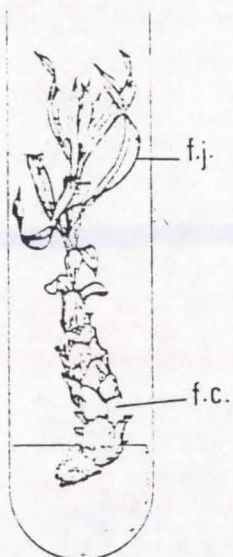
En tous cas, après leur isolement des explants et leur repiquage sur le milieu MSb^{*}, toutes ces pousses réacquièrent, plus ou moins rapidement, la morphologie normale de jeunes individus in vitro. Leur enracinement ne pose aucun problème particulier mais il n'a lieu, en général, que lorsque les plantes ont repris leur développement normal.

Après 3 à 4 repiquages sur le milieu de base, entre les plantes issues d'une même inflorescence, nous n'avons^{pas} observé de différences d'ordre qualitatif (tels que l'existence d'une pigmentation déficiente, un changement de la pilosité, une modification de la forme des feuilles, etc...) que l'on puisse déceler au stade in vitro. De plus, des comptages chromosomiques pratiqués sur 5 plantes originaires d'un même explant inflorescentiel de M.acuminata zabina mais dont l'ontogenèse était différente, ont montré qu'elles possédaient le nombre normal de chromosomes ($2n = 22$).

2-3 : Conclusions et discussion.

La mise en culture d'explants inflorescentiels, nous a permis de constater l'apparition de pousses feuillées. Leur formation dépend des

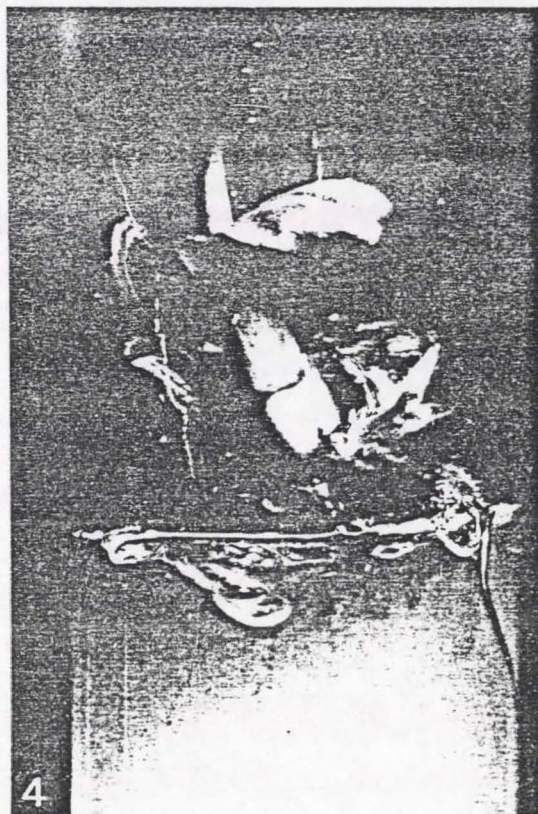
1



2



3



4

Planche V: Différentes modalités d'organogénèse des pousses feuillées

1: Plante issue de la réversion d'un jeune bouton floral; 2 et 3 : Développement de feuilles en forme d'écaille sur les plantes issues de néoformation; 4: Plantes issue de néoformation (MS*).
f.c.: feuille en forme de cuillère; f.ec.: feuille en forme d'écaille; f.j.:feuille à "caractéristiques juvéniles".

régulateurs de croissance utilisés et de leur concentration ainsi que de l'état de différenciation des tissus à partir desquels elles se produisent.

2-3-1 : Influence des régulateurs de croissance sur la formation et l'intensité d'obtention des pousses feuillées.

. Les milieux témoin (MSb) ou bien ne contenant que de la BAP (1 mg/l) ne permettent pas une activation des tissus (ceux-ci noircissent et meurent), alors que celle-ci se produit de façon générale, au niveau des tissus de l'aisselle des bractées et, à partir de jeunes boutons floraux en présence d'une auxine et d'une cytokinine. Toutefois, cette constatation ne concerne que les tissus que nous venons de citer dont le développement est fini (boutons floraux par exemple), car le méristème inflorescentiel, à développement indéfini, peut, lui, dans quelques cas, réverser vers un fonctionnement végétatif, sans que des substances de croissance soient ajoutées au milieu de culture.

. La présence simultanée d'AIA et d'une cytokinine dans le milieu de culture, favorise une initiation importante de pousses feuillées, cela aussi bien sur des cultures déjà âgées et repiquées tardivement sur des milieux de ce type (milieux MS^{*}_{A5B7,5} et surtout MS^{*}_{A4B4}) que sur des explants, mis directement sur de tels milieux (MS^{*}_{A2K2}); mais, à l'inverse, l'addition de fortes quantités de BAP dans le milieu, entraîne un noircissement des tissus et une réduction du nombre de plantes apparues.

L'intensité d'initiation des pousses feuillées varie aussi avec le génotype utilisé.

2-3-2 : Lieu d'initiation et morphologie des pousses feuillées.

Les diverses réactions observées sur les explants inflorescentiels, sur des milieux renfermant à la fois une auxine et une cytokinine, nous ont amené à distinguer 4 modalités différentes dans l'initiation des pousses, qui est fonction du lieu où elles prennent naissance dans l'explant, c'est-à-dire, de l'état de différenciation des tissus situés à ce niveau.

1- Réversion du méristème terminal inflorescentiel ou d'une portion de celui-ci vers un fonctionnement végétatif (Fig. 9 B(a)).

2- Néof ormation caulinaire directe d'un méristème végétatif à partir de tissus situés à l'aisselle des bractées les plus jeunes de l'explant (Fig. 9 B (b)) qui n'ont pas encore donné naissance à des bourgeons floraux .

3- Réversion à l'état végétatif de boutons floraux déjà mis en place, à l'aisselle de bractées plus âgées. La réversion se produit d'autant plus tardivement que le bouton floral est à une étape plus avancée de son développement (Fig. 9 B(c)).

4- Néof ormation caulinaire directe d'un méristème végétatif à partir de tissus jouxtant la base de fleurs déjà développées dans les aisselles de bractées les plus âgées de l'explant (Fig. 9B(d)).

Ces quatre modalités montrent, en réalité, l'intervention de deux phénomènes différents. Il s'agit, soit d'une réversion vers l'état végétatif d'une structure florale ou inflorescentielle plus ou moins engagée dans la voie reproductrice, soit de la néof ormation caulinaire directe d'un méristème végétatif, à partir des tissus de l'aisselle des bractées inflorescentielles.

La morphologie des pousses feuillées ainsi produites, est variable dans les premiers stades de leur développement et ces variations touchent en particulier la forme des premières feuilles formées.

La structure morphologique obtenue est en réalité en corrélation étroite avec la modalité de son apparition. Ainsi s'il s'agit de la réversion d'une structure reproductrice vers une pousse feuillée, les premières feuilles portées par celle-ci auront des caractères de pièces florales et, l'on passera progressivement à des feuilles qui présenteront de plus en plus de ressemblances avec la 1^{ère} feuille émise par la jeune plante issue de la germination de la graine. Dans le cas d'une néoformation directe, on obtient très vite, après seulement un petit nombre d'écailles, le dernier type de feuille citée.

2-3-3 : Ces pousses feuillées répondent-elles à une multiplication végétative conforme ?

Une fois que les pousses sont séparées de l'explant qui leur a donné naissance et repiquées sur un milieu témoin sans régulateurs de croissance, elles reprennent toutes un aspect semblable et comparable à celui déjà manifesté par les plantes provenant de la multiplication végétative in vitro à partir de fragments de rejets.

De plus les comptages chromosomiques effectués sur 5 pousses feuillées, provenant toutes de la réversion à l'état végétatif de structures reproductrices n'ont pas montré non plus de perturbations dans leur garniture chromosomique. Les résultats de ces comptages, bien qu'ils aient été effectués sur un effectif trop réduit, qui demanderait à être sérieusement augmenté et étendu aux diverses modalités de production de pousses feuillées, confirment les données de l'analyse morphologique. Par conséquent, l'observation n'a pas permis de déceler dans les conditions de culture in vitro des différences de nature qualitative entre les plantes d'une même inflorescence. Néanmoins, une telle comparaison ne prendra sa pleine valeur que lorsque les plantes seront testées au champ puisque, la quasi-totalité des caractères chez le bananier à la fois du point de vue quantitatif et qualitatif ne sont exprimés que dans la phase adulte, au

stade végétatif et surtout floral (à titre indicatif, 87 % des caractères de classification des bananiers se situent au niveau de l'inflorescence).

Le développement de plantes à partir des tissus reproducteurs, a déjà fait l'objet de nombreux travaux (MARTIN et coll., 1967; TRAN THANH VAN, 1973) chez d'autres végétaux. Sur l'oignon (Allium cepa L.), DUNSTEAN et coll (1979) ont montré que les meilleurs résultats étaient obtenus sur du matériel jeune, prélevé au stade pré-méiotique du développement du grain de pollen. Cet auteur a constaté comme nous, que l'initiation de méristèmes végétatifs se produisait avec des combinaisons de régulateurs de croissance très variées et qu'il existait aussi diverses modalités (5) dans l'ontogenèse des plantes ^{était} liées, là encore, au stade de différenciation des tissus où elles prenaient naissance. Parmi ces modalités, qui vont de la néoformation directe de méristèmes sur les pédicelles des boutons floraux à la réversion vraie de méristèmes floraux, certaines, sont très proches de celles que nous avons observées. Parmi les plantes qui ont pu être transférées dans les conditions de culture in-vivo aucunes différences morphologiques ni caryologiques n'ont été décelées.

Plus récemment, CONGER et coll. (1983) ont obtenu le développement de plantes sur des inflorescences de Dactylis glomerata L., issues semble-t-il de l'intérieur de la fleur et parfois des anthères. Aucune des 106 plantes isolées, à l'inverse de ce qui a été obtenu avec la Festuca gigantea Vill. (KASPERBAUER et coll., 1980) n'était haploïde mais 23 d'entre elles ne possédaient pas le stock normal de chromosomes ($2n = 28$); en outre, 5 plantes étaient albinos.

Donc, d'après les résultats obtenus dans la littérature, on constate que les pousses issues de tissus floraux ou inflorescentiels peuvent, selon les exemples, manifester ou non un certain polymorphisme.

En ce qui concerne le Bananier, les travaux que nous avons réalisés dans ce domaine ne nous permettent pas d'affirmer à l'heure actuelle que les pousses produites font toutes partie ou non de la multiplication conforme. Nous étions arrivé à la même conclusion à propos des plantes issues de fragments d'apex de rejets.

Dans le cas où une certaine variabilité pourrait être mise en évidence, il est vraisemblable qu'elle se manifesterait de façon différente lorsque les plantes sont issues de réversions de méristèmes terminaux de l'inflorescence (à développement indéfini) ou de boutons floraux (à développement fini) ou bien encore de néoformations directes à partir des tissus de l'axe inflorescentiel. Faute d'éléments de réponses en la matière et compte tenu du fait que les plantes que nous avons isolées paraissaient toutes semblables et qu'aucun cal visible n'a été noté, nous avons choisi de situer ces travaux pour l'instant dans le cadre de la multiplication conforme.

En tous cas ces travaux demanderaient à être repris. On devrait alors porter une attention particulière au choix d'un conditionnement des explants qui permette l'expression de chaque type d'ontogenèse, en ayant soin d'étudier de façon précise, les conséquences de cette ontogenèse sur le devenir ultérieur des plantes.

Une étude histologique est aussi nécessaire, qui permettra l'analyse des différents événements mis en jeu lors de l'initiation des plantes, et, en particulier, lors de l'organogenèse liée à la réversion des méristèmes floraux et inflorescentiels.

Nous terminerons ce chapitre en signalant que simultanément à la réversion ou à la néoformation de pousses végétatives, sur des explants inflorescentiels, on a constaté, sur des milieux dépourvus de régulateurs de croissance ou à

l'inverse contenant à la fois des auxines (AIA surtout, ANA et des cytokinines (BAP, K) l'apparition de cals blancs compacts, pourvus de protubérances arrondies dont nous reparlerons ultérieurement. Ces cals se sont formés en général en étroite contiguité avec les tissus de l'inflorescence qui ont été activés.

C) Analyse des processus conduisant à un élargissement de la variabilité
en culture in vitro.

1). Etude de la callogénèse à partir d'explants prélevés sur des plantes
cultivées in vitro.

Cette étude, rappelons le, a été effectuée à l'aide de fragments de plantes appartenant au CV. "Americani" de la série "Cavendish" et cultivées in vitro soit à la lumière, soit à l'obscurité.

1-1 : Callogénèse à partir de fragments de racines.

Nous avons mis en culture des fragments de 1cm de long, prélevés sur des racines aériennes ou bien plongeant dans le milieu.

Que ces fragments d'organes aient pour origine des plantes à l'obscurité ou à la lumière et qu'ils soient implantés horizontalement ou verticalement (la polarité ayant ou non été respectée), nous n'avons jamais pu obtenir des cals repiquables, lors des premiers essais préliminaires récapitulés dans le tableau II. Très rapidement après leur mise en culture, les explants noircissent puis meurent, et cela aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité.

Il nous a été possible par la suite d'isoler, dans un seul cas, une petite prolifération, produite sur 2,4 D et qui, à l'obscurité s'est nécrosée après le premier repiquage.

Devant la faiblesse des résultats obtenus, nous n'avons pas jugé bon de continuer nos investigations dans ce secteur.

1-2 : Callogénèse à partir de fragments de feuilles.

1-2-1 : Essais préliminaires : études de facteurs favorisant le phénomène.

Nous nous sommes attachés, dans un premier temps, à cerner les paramètres essentiels gouvernant la production d'un cal. Dans ce but, il nous a paru intéressant de rechercher l'influence de facteurs internes (tel

que la nature de l'explant) ou externes (comme l'équilibre adéquat de régulateurs de croissance à ajouter au milieu de culture ou certaines conditions de l'environnement (lumière ou obscurité)).

En ce qui concerne le milieu de culture, nous avons fait varier, dans ces essais préliminaires, les adjonctions en régulateurs de croissance, les autres constituants du milieu restant inchangés. Les combinaisons testées dans nos premiers essais étaient peu nombreuses (cf. tableau II) mais, par la suite, nous avons essayé un large éventail de combinaisons d'auxines et de cytokinines (cf. tableau VII.).

Les résultats qui vont être exposés représentent la synthèse des données obtenues dans tous les essais préliminaires effectués en tenant compte des différents paramètres étudiés. Ces données beaucoup trop fragmentaires, n'ont par permis une étude quantitative et nous avons dû, par conséquent, nous contenter souvent d'une évaluation qualitative portant sur une observation précise des réponses enregistrées.

1-2-1-1 : Influence de la lumière.

Quelle qu'ait été la composition du milieu, nous n'avons pas pu obtenir de proliférations lorsque les cultures sont mises à la lumière. Les explants noircissent très rapidement - 15 jours en général après leur mise en culture - puis meurent. Ils présentent, au niveau de la zone de contact avec le milieu dont la couleur reste inchangée, un boursoufflement des tissus, ceci lorsque les milieux contiennent des régulateurs de croissance.

A la suite de ces observations toutes nos expériences sur l'initiation de la callogénèse seront désormais réalisées sur des cultures qui seront placées, au moins pendant les deux premiers mois, à l'obscurité totale.

1-2-1-2 : Influence de l'adjonction de régulateurs de croissance

(cf. tableau VII).

. L'explant ne manifeste pas de réaction particulière lorsqu'il est placé sur le milieu (MSb^{*}) sans régulateurs (milieu témoin) ou bien contenant de faibles doses d'ANA ou d'AIA (0,1 mg/l) ou bien encore des cytokinines seules (BAP ou K pour des concentrations de 0,1 à 10 mg/l). Très rapidement, les tissus noircissent puis meurent.

On n'observe pas de changement de couleur du milieu.

. Lorsque le milieu contient des auxines seules telle que de l'ANA ou de l'AIA à des doses variant de 1 à 10 mg/l, les explants présentent un début de réponse au niveau de la zone de contact avec le milieu : on observe un grandissement des cellules des tissus superficiels suivi parfois d'un début de prolifération cellulaire violette ou noire (aux fortes concentrations, soit 10 mg/l). On assiste ensuite à une nécrose rapide des explants puis à leur mort et à un noircissement du milieu. Des combinaisons variées de ces deux auxines ne modifient pas sensiblement les résultats.

. Lorsque le milieu renferme à la fois des auxines comme de l'ANA et de l'AIA (de 0,5 à 10 mg/l) et des cytokinines telles que BAP et K (de 0,1 à 10 mg/l), de telle façon que le rapport auxines/cytokinines soit supérieur ou égal à 1, les explants manifestent alors un début de prolifération après un mois de culture. Elle naît au niveau des assises superficielles, épidermiques ou sous-épidermiques, de l'explant dans sa partie en contact avec le milieu. Ces cals, avec toutes les combinaisons testées, ont la même allure générale : ils sont compacts, homogènes, constitués de grandes cellules de teinte gris clair et n'atteignent jamais un grand développement.

Tableau n° VII. Essais préliminaires effectués à l'obscurité. Récapitulation des principaux résultats obtenus concernant l'influence de l'adjonction de régulateur de croissance.

Nature et concentration des régulateurs de croissance	Réaction de l'explant primaire
pas de régulateurs ANA ou AIA à 0,1 mg/l BAP ou K de 0,1 à 10 mg/l	<ul style="list-style-type: none"> - Explant sans réaction - Noircissement rapide puis mort de l'explant - Pas de changement de couleur du milieu
ANA ou AIA seules de 1 à 10 mg/l	<ul style="list-style-type: none"> - Grandissement des cellules des tissus superficiels au contact du milieu + début de prolifération violette - Noircissement, puis mort de l'explant - Noircissement du milieu
ANA ou AIA de 0,5 à 10 mg/l + BAP ou K de 0,1 à 10 mg/l et (Auxines) /cytokinines 1	<ul style="list-style-type: none"> - Prolifération des assises superficielles : cals compacts, homogènes, gris clair --- violet foncé - Noircissement, puis mort de l'explant - Noircissement intense du milieu
2,4 D ou 2,4,5 T seules à 1 mg/l	<ul style="list-style-type: none"> - Grandissement des cellules des assises superficielles; production de cals compacts, beiges ou plus blancs, d'origine interne - Cals isolés et repiqués sur le même milieu sans noircissement - Pas de noircissement du milieu - Ces cals peuvent être isolés et repiqués sur les mêmes milieux.

Au bout de deux mois de culture, quelle que soit leur taille, ils prennent une teinte violette foncée, laquelle s'accompagne toujours du noircissement intense du milieu. A ce moment, le cal se nécrose et meurt.

L'adjonction de charbon actif (0,5 , 1 et 3 g/l) ou bien de réducteurs (acide citrique (150 mg/l) + acide ascorbique (100 mg/l) + cystéine (2 mg/l)) ne freinent que très légèrement le noircissement du cal, et ne changent pas l'issue de la culture. Par ailleurs, ces cals ne peuvent être repiqués sans que la nécrose des tissus ne s'accélère et ce, même en début de culture.

Nous avons pu, dans un seul cas, entretenir un cal issu d'un fragment de gaine foliaire prélevé sur une plante in vitro étiolée, sur un milieu contenant de l'ANA (1 mg/l) et de la K (0,1 mg) et cela durant 3 mois. Au bout de ce laps de temps, il a présenté un développement de racines. Ce cal, après avoir été repiqué sur le même milieu a noirci , puis est mort.

. Si on emploie des substances telles que le 2,4 D ou le 2,4,5 T (à 1mg/l), la réaction des tissus est alors tout à fait différente. Sur ces milieux, des cals apparaissent seulement au bout de 45 jours de culture en moyenne. Leur origine se situe cette fois-ci dans les tissus internes de l'explant, au niveau des nervures. Cette prolifération lorsqu'on utilise le 2,4 D, est précédée d'un grandissement des cellules des tissus superficiels du limbe qui peuvent alors, parfois se décoller du reste de l'explant. Ces cellules qui ne se divisent pas, finissent par dégénérer.

Les cals sont compacts, pourvus de protubérances arrondies ou allongées de couleur beige avec le 2,4 D (Pl.VI.1); ils sont d'aspect plus lâche et de couleur plus blanche avec le 2,4,5 T (Pl.VI.2) . Ces derniers apparaissent en effet, comme étant constitués d'un enchevêtrement de petites structures élémentaires en forme de disque de 1 à 3 mm de diamètre dont le bord est légèrement

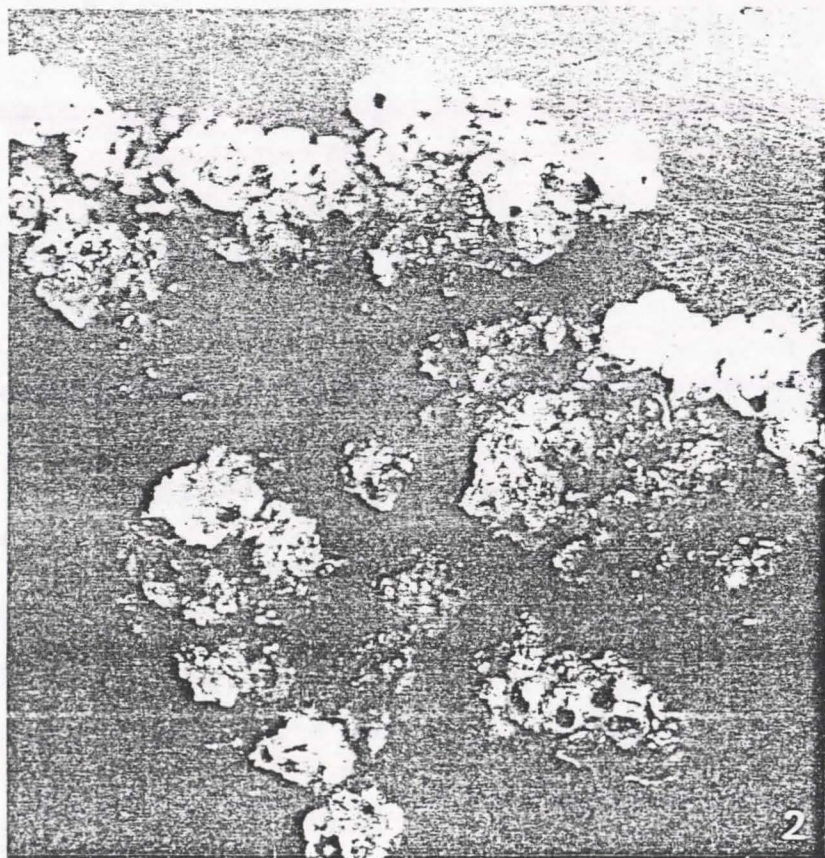
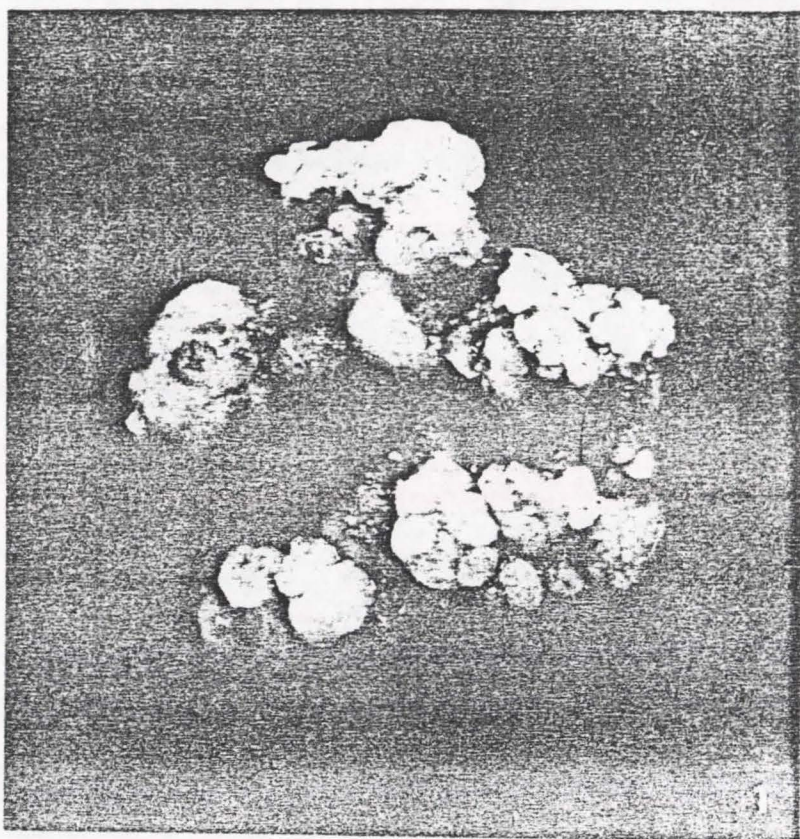


Planche VI : Callogénèse à partir de fragments foliaires.
 1: cal obtenu avec le 2,4 D.
 2: cal obtenu avec le 2,4,5 T.

renflé et le centre souvent marqué par un massif de cellules beaucoup plus denses qui fréquemment brunit dans les cultures âgées.

Tous les cals, obtenus avec le 2,4 D et le 2,4,5 T, peuvent être isolés et repiqués sur les mêmes milieux sans qu'aucun phénomène de noircissement, ni de nécrose ne survienne.

Nous avons remarqué que, si le 2,4 D (à 10 mg/l) est utilisé avec de la BAP (10 mg/l) ou en association avec de l'ANA (ANA à 1 mg/l et 2,4 D 9 mg/l) et de la BAP (10 mg/l), on peut alors provoquer le développement des proliférations compactes grisâtres, régulières d'origine superficielle au sein desquelles, apparaissent des cals plus compacts et blanchâtres. Elles peuvent être repiquées sans montrer aucun changement, mais noircissent et se nécrosent lorsque l'on supprime le 2,4 D du milieu.

1-2-1-3 : Influence de l'explant.

Les résultats positifs obtenus dans les différents essais réalisés nous ont permis de nous rendre compte que la réaction de callogénèse des tissus superficiels est toujours beaucoup plus marquée chez les explants prélevés au niveau de la jonction du pétiole avec le limbe que chez ceux originaires des autres parties de la feuille. Par ailleurs, nous avons également pu constater que, dans tous les cas où l'explant provient de plantes in vitro étiolées, la callogénèse des tissus superficiels est plus intense et durable.

1-2-1-4 : Conclusions.

Dans ces essais préliminaires, nous avons analysé un certain nombre de facteurs à respecter (en particulier : équilibre de régulateurs de croissance à adopter) pour obtenir un cal de façon répétitive.

De cette étude purement qualitative, nous pouvons tirer un certain nombre de renseignements intéressants portant sur le noircissement des explants mis en culture, et sur l'action des régulateurs de croissance.

1-2-1-4₁ : Problèmes posés par le noircissement des tissus et des milieux.

Dans les essais effectués, l'absence ou l'arrêt rapide de la prolifération des fragments implantés sur bon nombre de combinaisons en régulateurs de croissance est très certainement lié(e) au noircissement des explants et des milieux de culture qui très vite entraînent la nécrose et la mort des tissus.

Ce phénomène de noircissement est très vraisemblablement dû à l'oxydation de composés phénoliques. Cette opinion semble confortée par le fait que, toutes les cultures sont mortes très rapidement à la lumière à la suite d'un noircissement abondant des tissus qui est retardé sur du matériel provenant de plantes étiolées. On sait, en effet, que l'oxydation des phénols est plus rapide et plus intense à la lumière (ZAPROMETOV, 1978). La production et l'oxydation des phénols paraissent être des phénomènes si rapides et si intenses chez le Bananier que leurs actions néfastes sur les cultures ne peuvent être contre-carrées par l'apport de charbon actif ou de réducteurs dans le milieu. Même dans les cas où le cal peut quand même se former et proliférer (en particulier avec du matériel étiolé), la moindre blessure ou désorganisation, lors d'un repiquage par exemple, stimule cette oxydation.

Il est à noter que le noircissement de l'explant est consécutif aux traumatismes pratiqués lors de son isolement et celui du milieu, au déclenchement d'une prolifération cellulaire d'origine superficielle qui se produit lorsque le milieu contient des auxines et surtout, à la fois, des auxines et des cytokinines. Le seul traitement efficace pour combattre le noircissement des tissus et du milieu est l'incorporation, dans ce dernier, de substances

telles que le 2,4 D ou le 2,4,5 T. En effet, les cals d'origine superficielle, obtenus avec du 2,4 D, de l'ANA et de la BAP, ne noircissent pas; ils gardent une couleur gris clair et croissent sans montrer de signes de dépérissement. Ce résultat avait déjà été obtenu par d'autres chercheurs (BRASIL, 1982) : la présence de 2,4 D ou du 2,4,5 T dans le milieu inhiberait la formation des phénols. Par ailleurs, nous avons constaté que les cals d'origine interne obtenus avec seulement le 2,4 D ou le 2,4,5 T conservent une teinte claire et ce, après plusieurs repiquages.

1-2-1-4₂ : Action différente des régulateurs de croissance selon leur nature.

Les explants déposés sur le milieu témoin ou sur des milieux ne contenant que des cytokinines ou de faibles doses d'auxines ne manifestent aucune réaction. Il faut qu'il y ait au moins 0,5 mg/l d'auxine dans le milieu pour qu'on puisse noter une certaine stimulation des tissus. De plus, l'action de ces régulateurs est différente selon leur nature. L'AIA et l'ANA touchent spécifiquement les tissus superficiels et ne peuvent seuls ou que très faiblement aboutir au développement d'un cal, il faut la présence d'une cytokinine pour qu'une prolifération apparaisse. Le 2,4 D et le 2,4,5 T semblent avoir la même action sur les tissus superficiels mais, en plus, ils stimulent le développement, dans les tissus profonds, d'un cal dont la morphologie est très différente du cal issu des tissus superficiels.

Ces réactions correspondent à des compétences tout à fait différentes des cellules sollicitées et/ou à des interventions différentes des régulateurs auxiniques au niveau du génôme. Il semble que certaines cellules aient besoin

à la fois d'auxines et de cytokinines pour se multiplier alors que d'autres n'ont besoin que de certaines auxines. Nous pourrions supposer que l'AIA et l'ANA aient un mode d'action identique à celui du 2,4 D et du 2,4,5 T mais que ces régulateurs n'aient pas le temps de promouvoir une éventuelle initiation de la callogénèse avant que les phénols oxydés aient complètement détruit la culture.

Ces essais préliminaires ont apporté, certes, des renseignements intéressants concernant, en particulier, la localisation différente de la réponse dans les tissus de l'explant, suivant le ou la combinaison de régulateurs employés.

Toutefois, dans le but de mieux maîtriser le phénomène de callogénèse, nous avons choisi dans un second temps, de nous intéresser de façon plus approfondie aux cals obtenus sur les milieux contenant du 2,4 D et du 2,4,5 T, qui nous ont donné les résultats les plus prometteurs.

1-2-2 : Etude de la callogénèse obtenue avec des milieux contenant du 2,4 D et du 2,4,5 T.

Nous avons redéfini, avec plus de précision, les facteurs qui influent sur l'initiation de la callogénèse obtenu avec le 2,4 D et le 2,4,5 T (nature exacte de l'explant, son positionnement sur le milieu, modification des composantes du milieu) et ceci, pour accroître significativement le taux d'apparition des cals sur les explants. Mais l'étude des paramètres de culture ensuite, a été plus destinée à des essais de modification de l'organogénèse des cals et moins un travail systématique de leur influence sur la callogénèse elle-même. En conséquence, une étude quantitative de ces paramètres (croissance

en poids frais et sec par exemple) n'a pas été possible car tous les cals obtenus ont été utilisés pour des traitements caulogènes. Tous ceux qui ne présentaient pas la morphogénèse désirée ont été écartés.

Enfin nous avons entrepris une étude histologique du développement de ces cals, en raison de leur morphologie tout à fait particulière, surtout pour ceux obtenus avec le 2,4,5 T.

1-2-2-1 : Influence de paramètres liés à l'initiation et à la croissance du cal.

2-2-1₁ : Positionnement de l'explant sur le milieu :

Nous avons remarqué que les explants de feuilles vertes mises en culture, ^{ne}présentent des cals que dans la portion au contact ou proche du milieu, les autres tissus se nécrosant rapidement. Par contre, lorsque les explants sont déposés horizontalement, face dorsale contre le milieu, les cals apparaissent au niveau de tous les tissus alors en contact avec celui - ci . Ainsi, en utilisant du 2,4 D (à 1 mg/l), il est possible d'obtenir, en particulier sur des explants de gaine, des cals allongés, en forme de "boudin" qui suivent parfaitement la nervation de ce fragment d'organe sur toute sa surface de contact avec le milieu.

Aussi le positionnement des explants - à plat, face dorsale contre le milieu - sera retenu pour la suite de notre étude.

1-2-2-1₂ : Influence de la zone de prélèvement de l'explant dans la feuille.

Des feuilles vertes ont été découpées transversalement en cinq parties (zones 1 à 5, Fig.n°10). Les explants sont déposés sur les milieux (MSb* contenant du 2,4 D ou du 2,4,5 T à 1 ml) à raison de 12 explants par ^{niveau}

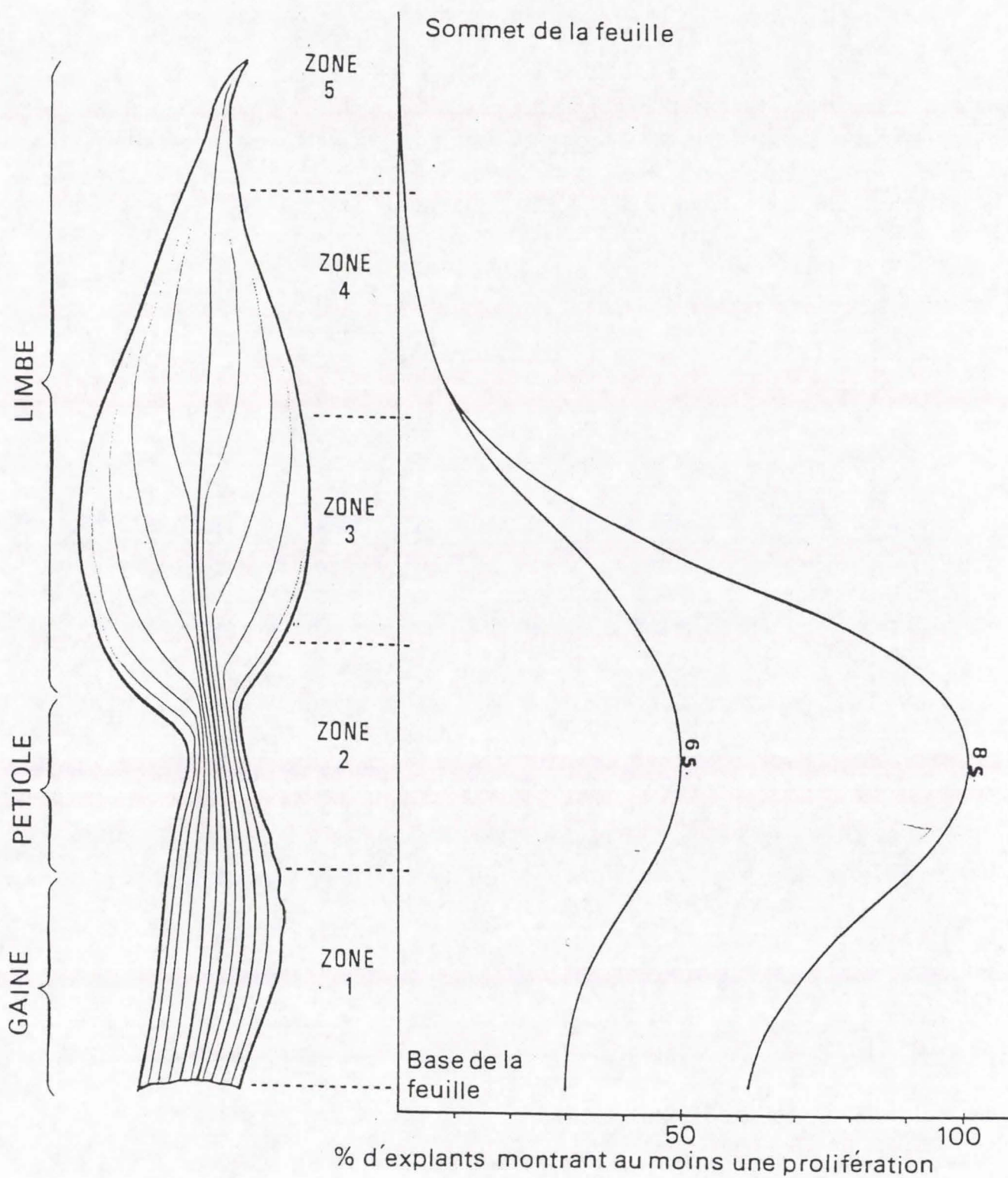


Figure 10: Taux de réactivité des explants selon le niveau de prélèvement dans la feuille (sur 2,4,5 T à 1 mg/l).

de feuille et par milieu. Les observations sont faites au bout de 6 et 8 semaines de culture à l'obscurité. Avec le 2,4,5 T par exemple, au bout de 6 semaines, 50% des explants de la zone 2 et 30% de ceux de la zone 1 présentent au moins une prolifération cellulaire. Ensuite, à mesure que l'on se rapproche de la partie distale de la feuille, le taux de réactivité diminue progressivement jusqu'à devenir nul pour les explants prélevés dans la zone 5. Après 8 semaines de culture, la réactivité des tissus reste nulle pour les explants de la zone 5, alors que 60% des explants de la zone 1 et 100% de ceux de la zone 2 présentent au moins une prolifération (Fig.10).

La vitesse de croissance des cals, une fois qu'ils sont apparus semble être la même, quelle que soit la zone de prélèvement de l'explants, dans la feuille, que ce soit avec le 2,4 D ou le 2,4,5 T.

1-2-2-1₃ : Importance de l'état physiologique de la feuille.

Nous avons mis en culture des fragments de feuilles de la zone 2 la plus apte à la callogénèse, prélevés, soit sur des plantes à la lumière, soit sur des plantes à l'obscurité, (12 explants par condition et par milieu). Au bout de 6 semaines de culture à l'obscurité, à l'inverse de ce que nous avons observé pour les cals d'origine superficielle, nous n'avons observé aucune différence selon l'état physiologique de l'explant que ce soit pour la vitesse d'apparition des cals ou bien pour la croissance de ces derniers.

1-2-2-1₄ : Modification des composants du milieu.

Les expériences qui vont suivre ont été effectuées sur 12 explants de la zone 2 pour chacun des milieux utilisés.

- changement de la concentration en régulateur de croissance : la concentration optimale en régulateur de croissance se situe, aussi bien pour le 2,4D

que pour le 2,4,5 T, entre 0,5 et 1 mg/l. En dessous de 0,5 mg/l et pour 20 mg/l et au dessus, les explants ne présentent plus de réactions; ils noircissent puis meurent rapidement. Entre 5 et 15 mg/l, l'apparition des cals est fortement ralentie; les cultures laissées sur ces milieux noircissent et meurent au bout de deux mois.

- changement de la concentration en saccharose : divers essais ont montré que l'apparition des cals n'est pas modifiée lorsque le milieu ne contient que 15 g/l de saccharose au lieu de 20 g/l. A 10 g/l, il n'y a pas de callogénèse et celle-ci est fortement ralentie à 30 et 40 g/l. A ces dernières concentrations, les cals ont tendance à noircir et meurent au bout de deux mois. Aussi conserverons-nous la concentration de 20 g/l de saccharose.

- changement de la composition en sels minéraux : le remplacement des macro et microéléments de MS par ceux du milieu N₆ (cf. annexe III), plus adapté à priori aux Monocotylédones, ne semble avoir modifié ni la morphologie, ni la vitesse d'apparition, ni la croissance des cals obtenus avec le 2,4 D et le 2,4,5 T.

1-2-2-2 : Etude histologique de l'initiation de la callogénèse.

L'initiation de la callogénèse a été étudiée sur des proliférations obtenues principalement avec le 2,4,5 T et sur des fragments de feuilles prélevés dans la zone 2 c'est à dire au niveau de la jonction du pétiole et du limbe. La réaction des tissus n'étant pas synchrone, il est possible de trouver dans un même explant, tous les stades de développement du cal. Toutes les observations ont été faites dans l'intervalle de 40 jours après la mise en culture.

1-2-2-2₁ : Anatomie de la feuille lors de la mise en culture.

La planche VII.1 et 2 montre une coupe transversale effectuée au milieu d'un limbe de feuille de bananier cultivée, in vitro au moment de la mise en culture. L'anatomie classique pour une feuille de Monocotylédone, comporte certaines particularités. L'organisation des tissus du limbe n'est pas identique dans toutes les portions de celui-ci.

Dans la partie située à mi-distance entre le bord du limbe et la nervure médiane, les tissus présentent, en général, une symétrie dorsoventrale : un épiderme (ep.), qui comporte des stomates sur la face dorsale et pas de cuticule, recouvre l'ensemble du limbe. En dessous, nous remarquons, la présence d'un hypoderme (hy.) constitué d'une seule couche de cellules parenchymateuses allongées, dans le sens radial, dont certaines contiennent des cristaux d'oxalate de calcium, puis d'un parenchyme cortical chlorophyllien (p.c.) formé de deux ou trois couches de cellules arrondies. Au centre, un parenchyme médullaire (p.m.), à grandes cellules, entoure de grandes lacunes (la.) dont la taille diminue à mesure que l'on se rapproche des bords du limbe. De façon générale, tous ces tissus semblent plus développés face ventrale que face dorsale où le parenchyme chlorophyllien et l'hypoderme sont absents au niveau de la nervure centrale.

Le parenchyme interlacunaire est soutenu par les faisceaux libéro-ligneux (f.l.l.) (Pl.VII.3 et 4) qui sont recouverts à chaque pôle de cellules de sclérenchyme (s.c.i.) qui au-dessus du bois forment une calotte. Le xylème (x) est souvent constitué d'un seul gros vaisseau accompagné parfois d'un ou de deux autres vaisseaux (x) plus petit(s), alors que le phloème (ph.) est bien développé; des cellules compagnent (c.c.) et parfois des cellules à mucilage lui sont accolées. Les faisceaux libéro-ligneux sont noyés dans un parenchyme périvasculaire (p.pv.), à petites cellules, les isolant ainsi des autres tissus du limbe.

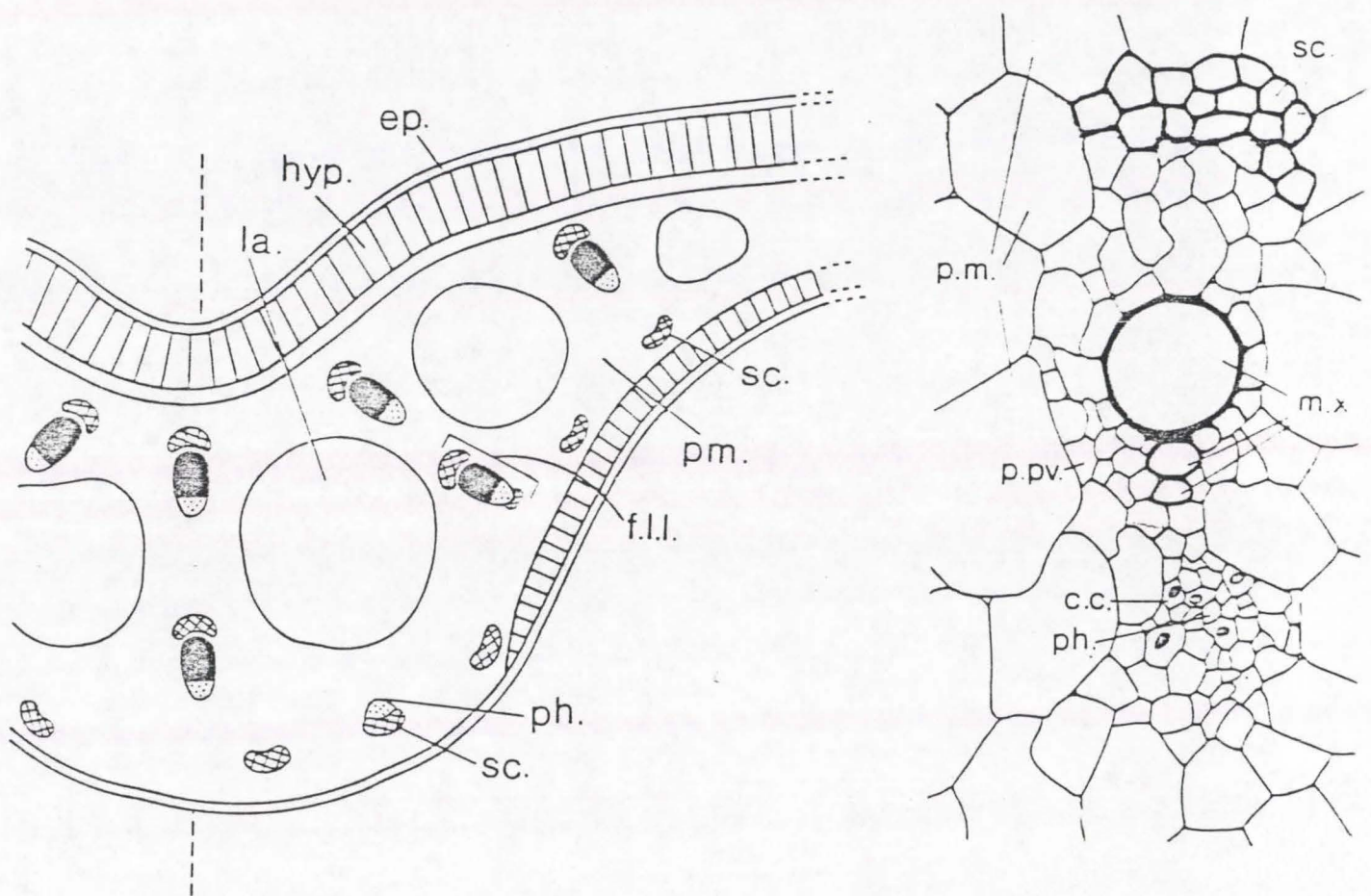


Planche VII : Anatomie de la feuille témoin lors de sa mise en culture. 1 et 2 : photo et schéma d'ensemble de la moitié d'une coupe transversale réalisée dans la partie médiane du limbe - 3 et 4 : photo et schéma de détail d'un faisceau libéro-ligneux.
 ep.: épiderme; hy.: hypoderme; p.c.: parenchyme cortical chlorophyllien; p.m.: parenchyme médullaire; la.: lacune; sc.: sclérenchyme; f.l.l.: faisceau libéro-ligneux; x.: xylème; ph.: phloème; c.c.: cellule compagne; p.pv.: parenchyme périvasculaire; FV.: face ventrale; FD.: face dorsale.

Au niveau de la nervure centrale, nous avons, déjà signalé que les couches de cellules hypodermiques et chlorophylliennes ont disparu sur la face dorsale externe. Par ailleurs, nous trouvons fréquemment entre les lacunes, deux ensembles de faisceaux libéro-ligneux, l'un au-dessous de l'autre, avec pour chacun d'eux, un seul massif de sclérenchyme, toujours situé du côté du bord de la feuille. Enfin, face dorsale d'autres îlots de sclérenchyme (s.c.) indépendants des faisceaux libéro-ligneux, mais entourant parfois quelques cellules de phloème et situés dans le parenchyme médullaire à grandes cellules, viennent renforcer la solidité du limbe.

Pour comprendre la structure des faisceaux libéro-ligneux et le sens de la différenciation du xylème en particulier, il nous a fallu nous référer à l'anatomie de la tige et de la gaine de bananier (Pl.VIII). Pour cela, des coupes transversales et longitudinales exécutées à main levée et colorées au camino-vert, ont été faites, d'une part, dans la tige vraie de plantes du cv. "Americani" cultivées in vitro, à l'obscurité, et, d'autre part, le long de la tige foliaire et dans le limbe de la feuille, de plantes du cv. "Poyo" cultivées in vivo, dans les serres. Celles-ci nous ont permis de montrer que :

. la différenciation du bois dans la tige de plantes in vitro est centrifugée et prend une forme caractéristique en "V" (Pl.VIII.1).

. le proto(px.) et le métaxylème(mx.) sont présents à la base de la gaine foliaire appartenant à des plantes in vivo (Pl.VIII.2) A mesure que l'on se rapproche du limbe, dans la gaine, les vaisseaux de protoxylème disparaissent alors que, conjointement, des petits vaisseaux de métaxylème viennent s'intercaler entre le ou les gros vaisseaux de métaxylème et le liber (Pl.VIII.3).

Dans le limbe, on ne trouve plus finalement qu'un gros vaisseau accompagné d'un ou deux petits vaisseaux de métaxylème (Pl.VIII.5).

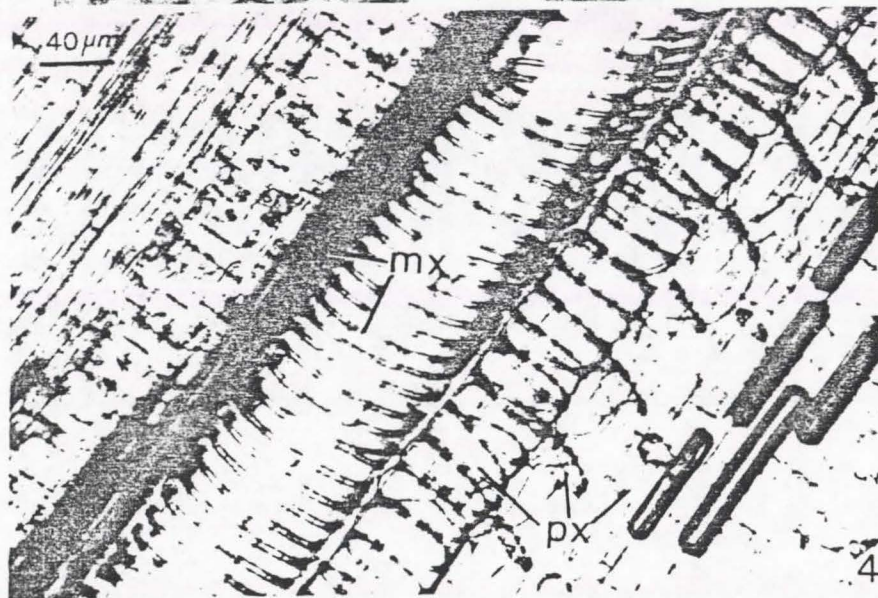
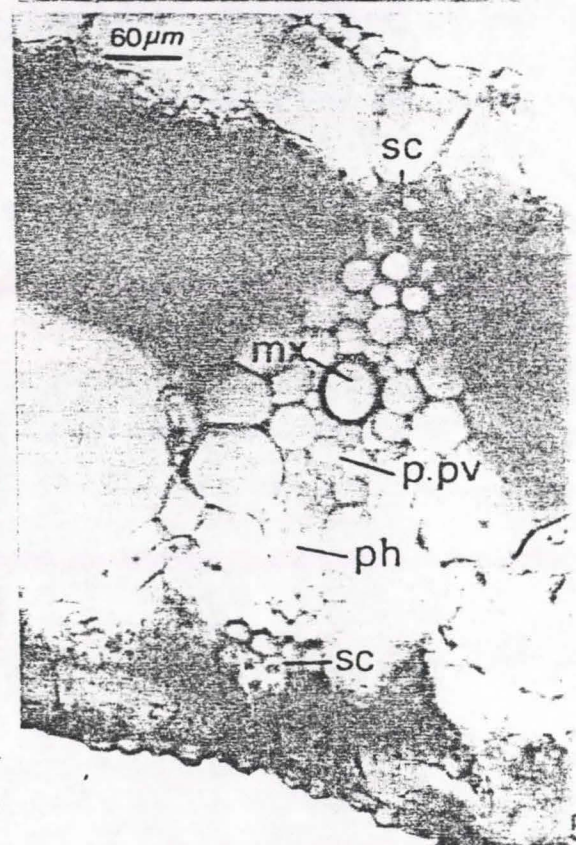
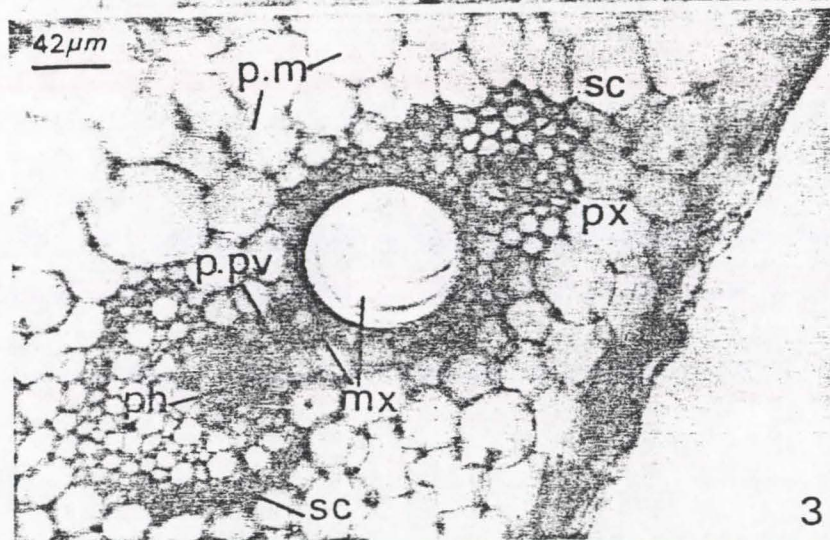
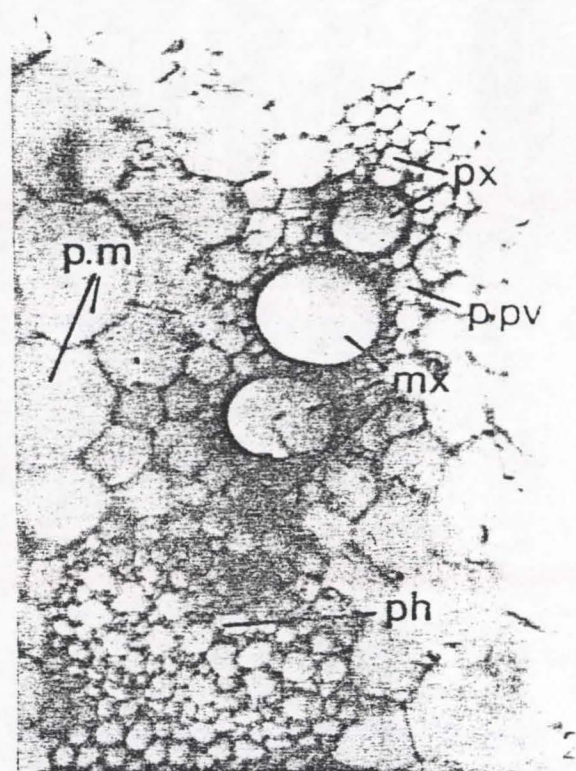
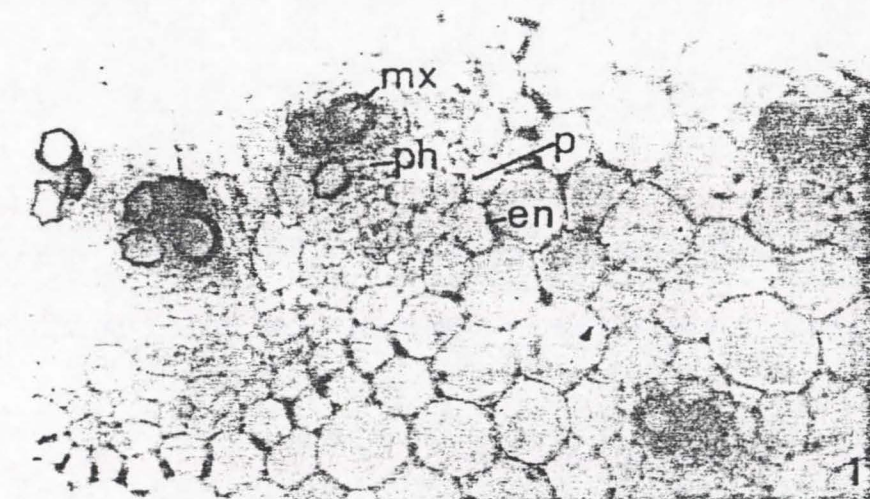


Planche VIII : Différenciation du xylème et structure des faisceaux libéro-ligneux chez le bananier.

1.2.3.5.: coupes transversales pratiquées respectivement dans une tige de plante *in vitro* (1), à la base de la gaine foliaire (2), dans celle-ci à mi-hauteur (3), et dans le limbe d'une plante *in vivo* (5).

4: coupe longitudinale effectuée à mi-hauteur de la gaine foliaire d'une plante *in vivo*.

px.: protoxylème; mx.: métaxylème; ph: phloème; sc.: sclérenchyme; p.pv.: parenchyme périvasculaire; p.m.: parenchyme médullaire; en.: endoderme à cadre; p.: péricycle.

Des coupes longitudinales faites dans les gaines foliaires in vivo sont venues confirmer ces observations concernant le sens de la différenciation du bois (Pl. VIII.4).

La comparaison de nos résultats concernant des feuilles de bananiers in vitro avec ceux, relatifs à des feuilles de bananiers in vivo, d'une étude histologique faite par SKUTCH (1927) sur des plantes du cv. "Gros Michel" et par nous mêmes sur le cv. "Poyo" nous révèle les faits suivants :

Tous les tissus sont présents dans la feuille de plante in vitro et leur organisation générale n'est pas modifiée. Par exemple, bien que la taille des cellules soit plus petite in vitro, ce qui n'a rien d'étonnant, compte tenu de la miniaturisation intervenant toujours dans ces conditions de culture (NOZERAN et coll., 1982), les relations de proportionnalité entre les éléments (lacunes, vaisseaux, parenchymes) sont à peu près respectées.

Il existe néanmoins, sur certains points, des différences que nous allons préciser :

. Dans le limbe de plantes in vitro (Pl.VII.1et2), les cellules de l'hypoderme sont allongées radialement et réparties sur une seule assise, et les cellules chlorophylliennes sont arrondies. Dans le limbe de plante in vivo (Pl.VIII.5 et observations de SKUTCH), la forme de ces cellules et celles des assises chlorophylliennes sont inversées par rapport à ce que l'on trouve in vitro.

1-2-2-2₂ : Initiation et développement du cal.

Après 15 jours de culture, les cellules de l'hypoderme grandissent mais ne se divisent pas. Par ailleurs, des petites cellules appartenant au parenchyme péri-vasculaire et, beaucoup plus rarement, des cellules sclérenchymateuses qui jouxtent les vaisseaux de xylème et de phloème, manifestent un gonflement limité ainsi qu'une densification de leur contenu cellulaire (Pl.IX.1).

Puis, au bout de 20 jours environ, ces cellules dont le cytoplasme est dense, se divisent plusieurs fois (Pl.IX.2). Il est possible de trouver au début, pour chaque faisceau, quatre ou cinq cellules qui entrent en mitose, mais, par la suite, c'est l'ensemble du parenchyme péri-vasculaire à petites cellules qui est touché (Pl.IX.3). Il y a alors formation au niveau d'un seul faisceau libéro-ligneux (Pl.IX.4) d'une ou de plusieurs proliférations cellulaires indépendantes (Pl.X.3).

Au bout d'un mois de culture, ces proliférations cellulaires sont devenues de véritables cals dans lesquels on distingue déjà une zone de cellules disposées radialement (Pl.IX.4) : sur la partie externe du cal, on remarque en effet des cellules dont le cytoplasme est très dense et qui se divisent radialement formant ainsi une zone rappelant par son fonctionnement celui d'un cambium. Ainsi, l'avons-nous qualifiée de zone pseudocambiale (z.p.c.) (Pl.X.1). Celle-ci repousse les nouvelles cellules surtout vers l'intérieur du cal et beaucoup moins vers l'extérieur. Ultérieurement, une ébauche racinaire peut apparaître dans la partie toujours interne du cal. Les racines restent bloquées sur les milieux contenant 1 mg/l de 2,4,5 T (Pl.X.2).

Il ne nous est pas possible de préciser si chaque prolifération provient d'une seule ou de plusieurs cellules initiales. Quoiqu'il en soit, il est possible, nous l'avons dit, de trouver plusieurs cals, au même niveau, autour d'un faisceau libéroligneux (Pl.X.3). Ceux-ci sont strictement issus de cellules parenchymateuses proches des faisceaux, attendu qu'aucune autre prolifération n'a été observée dans les autres tissus de la feuille.

Les masses callogènes décrites, complètement développées, prennent diverses formes (globulaire, (gl.) en coupole, en disque (d.) ou en structure invaginée (in.), mais leur organisation interne est toujours respectée, à savoir ^{la} présence d'une zone "cambiale" de cellules du côté externe, et, du côté

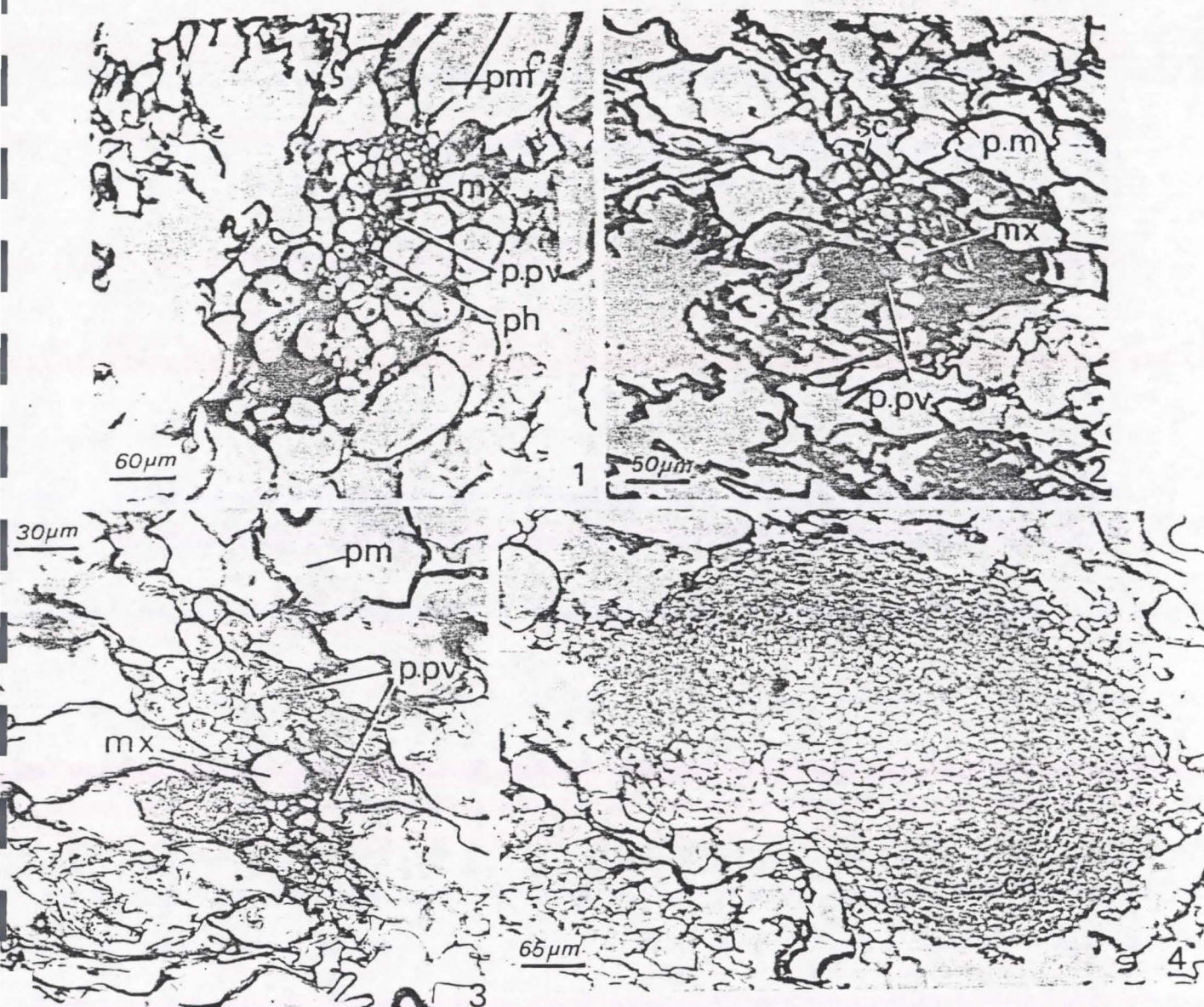
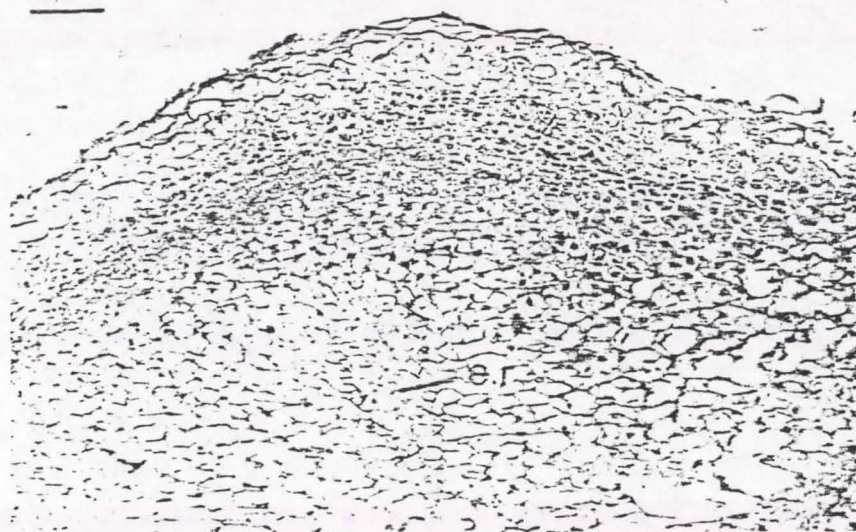
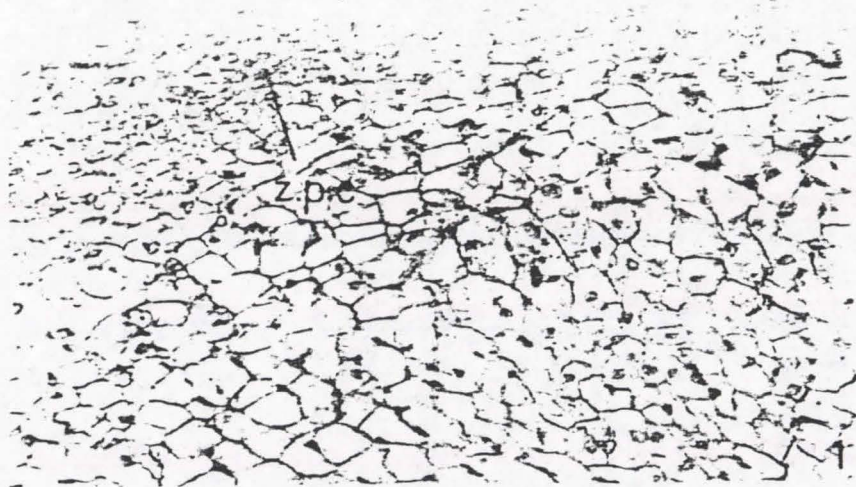
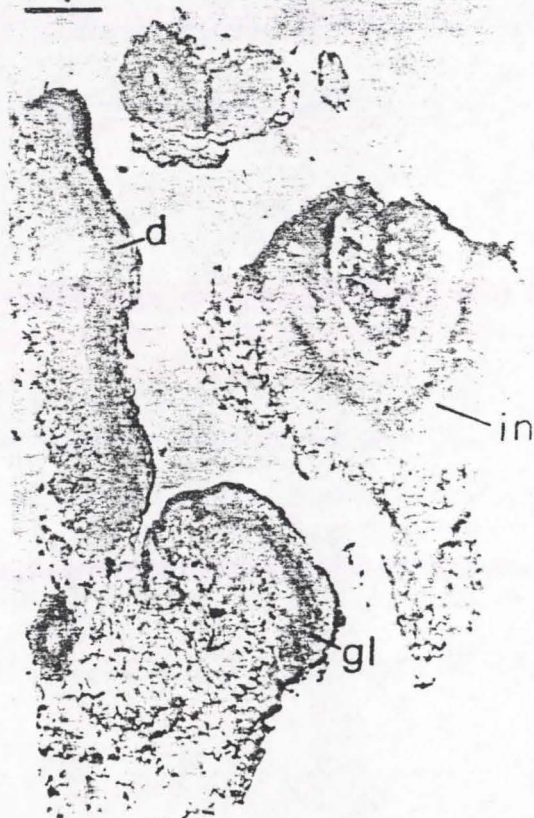


Planche IX : Initiation et développement des cals sur des milieux avec du 2,4,5 T. 1: gonflement et densification de cellules du parenchyme périvasculaire (après 15 jours de culture); 2 et 3 : densification et cloisonnement de ces cellules; 4: développement d'un cal (ca) montrant , dans sa partie externe, une zone pseudo-cambiale (z.p.c.).

sc : sclérenchyme; mx : gros vaisseau de métaxylème; ph : phloème; p.p.v.: parenchyme périvasculaire; p.m.: parenchyme médullaire.



270 μm



130 μm



5

Planche X: Initiation et développement des cals (suite). 1: détail de la zone pseudocambiale (z.p.c.)- 2: apparition de l'ébauche racinaire (e.r.) coupée tangentielle- 3: initiation de deux cals au niveau d'un seul faisceau libéro-ligneux- 4: diverses formes prises par chaque prolifération (gl: globulaire; d: en disque; in: en structure invaginée)- 5: emboîtement de structures élémentaires en forme de disque avec du côté interne l'ébauche racinaire (e.r.).

interne, d'une ébauche de racine (Pl.X.4). Les cals obtenus avec le 2,4,5 T sont constitués d'un enchevêtrement de structures callogènes élémentaires en forme de disque (Pl.X.5), ce qui confirme l'aspect déjà noté à l'oeil nu. Le massif de cellules plus denses brunissant par la suite, observé alors souvent au centre de ces disques, correspond à l'ébauche de racines qui finit par se nécroser (Pl.VI.2).

Les diverses étapes de l'initiation et du développement des cals, exposées ci-dessus, correspondent à celles observées sur des cals obtenus avec 2,4,5 T.

Des coupes réalisées dans des cals formés avec le 2,4 D, montrent que leur initiation et leur développement ne diffèrent guère de ce que nous venons de décrire. Cependant, dans ce cas, la zone génératrice de cellules fonctionne indéfiniment, sans qu'il y ait différenciation de racines. De plus les cals gardent leur forme globulaire (pas d'aplatissement ni invagination). Ce mode de fonctionnement explique l'aspect de ces cals observé à l'oeil nu avec le 2,4 D : cals compacts pourvus de protubérances élémentaires plus ou moins arrondies (Pl.VI.1).

1-2-2-3 : Entretien des cultures et essais d'induction de la caulogénèse.

1-2-2-3₁ : Entretien des cultures et importance de l'état sanitaire des plantes.

Les cals sont isolés de l'explant, après 4 mois $\frac{1}{2}$ de culture en moyenne. Ils prolifèrent plus lentement avec le 2,4 D qu'avec le 2,4,5 T (en volume), et gardent leur aspect, au cours des repiquages, si la concentration initiale en régulateurs de croissance est maintenue. Les cultures sont entretenues indifféremment à la lumière ou à l'obscurité.

Enfin, les deux morphologies de cals sont interchangeables : en effet, lorsque l'on transfère les cultures obtenues avec du 2,4 D dans un milieu contenant du 2,4,5 T, les cals se développent en présentant la forme classique de ceux obtenus avec le 2,4,5 T d'emblée, et inversement.

Nous avons observé, dans certains cas, des croissances très lentes de cals ainsi qu'une tendance au brunissement sans que l'on puisse à priori en donner la raison. Après plusieurs repiquages (de 3 à 5), nous nous sommes aperçus que des infections bactériennes apparaissaient sur le milieu, strictement localisées au niveau du matériel végétal et ce, sans qu'aucune autre trace d'infection n'ait pu être décelée dans les cultures précédentes. L'apparition de ces infections entraîne irrémédiablement le noircissement, puis la mort du cal. Nous n'avons pas déterminé dans ce cas, de façon précise la nature du ou des agents infectieux.

1-2-2-3₂ : Essais de traitements visant à favoriser la caulogénèse

Les expériences visant à faire apparaître la caulogénèse ont été menées sur les deux formes de cals (obtenus avec le 2,4 D et le 2,4,5 T). De façon générale, nous avons cherché à baisser la concentration de ces deux substances dans les milieux, en augmentant simultanément ou non, la concentration en cytokinines et parfois en d'autres auxines (AIA, ANA et AIB).

Chaque combinaison de régulateurs a été testée pour chaque forme de cal sur 12 boîtes de Pétri, contenant un milieu solide à raison de 4 explants par boîte, ces derniers ayant une taille minimale de 1 cm de diamètre. Par ailleurs nous avons fait quelques essais de culture en milieu liquide non agité. Toutes les expériences, aussi bien en milieu solide que liquide, ont été faites à l'obscurité totale.

Sur les milieux solides, si l'on baisse la concentration en 2,4 D et 2,4,5 T progressivement au cours des repiquages successifs (0,5; 0,3 et 0 mg/l) ou si l'on ôte ces substances en une seule fois, les cals noircissent et meurent rapidement (Pl.XI.1 et 2). Ils peuvent être maintenus en survie à condition que la concentration du régulateur soit égale ou supérieure à un seuil critique qui est de 0,5 mg/l pour le 2,4 D et 0,3 mg/l pour le 2,4,5 T mais ils ne manifestent jamais de caulogénèse.

A ces concentrations, les cals présentent certaines modifications :

- un cal obtenu avec du 2,4 D a montré le développement d'une prolifération très friable dont la croissance est très rapide. Celle-ci peut être entretenue à la lumière comme à l'obscurité, sur le même milieu (0,5 mg/l) mais noircit et meurt si l'on baisse (à 0,3 et 0,1 mg/l) la concentration en 2,4 D.

- les racines des cals obtenues avec le 2,4,5 T (à 1 mg/l) se développent lorsque ceux-ci sont passés sur un milieu n'en contenant que 0,3 mg/l (Pl.XI.3).

Le rajout simultané de cytokinines dans le milieu (BAP, K, Zip de 0,1 à 1 mg/l), la concentration du 2,4 D et 2,4,5 T variant de 0,3 à 1 mg/l, entraîne le noircissement et la mort d'autant plus rapide que la quantité de cytokinines est plus importante par rapport aux auxines. Cette nécrose des tissus ne peut être empêchée par l'addition dans le milieu de réducteurs ou bien de charbon actif.

Il nous a jamais été possible d'entretenir un cal d'origine foliaire plus de deux repiquages successifs sur des milieux contenant à la fois du 2,4 D ou du 2,4,5 T et des cytokinines en quantité égales (0,5 et 1 mg/l), et nous n'avons jamais pu, par conséquent, obtenir de néoformations caulinaires.

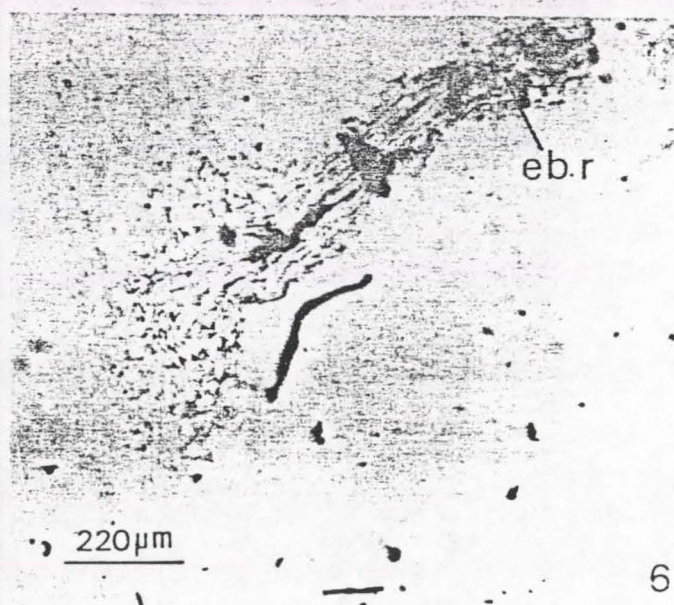
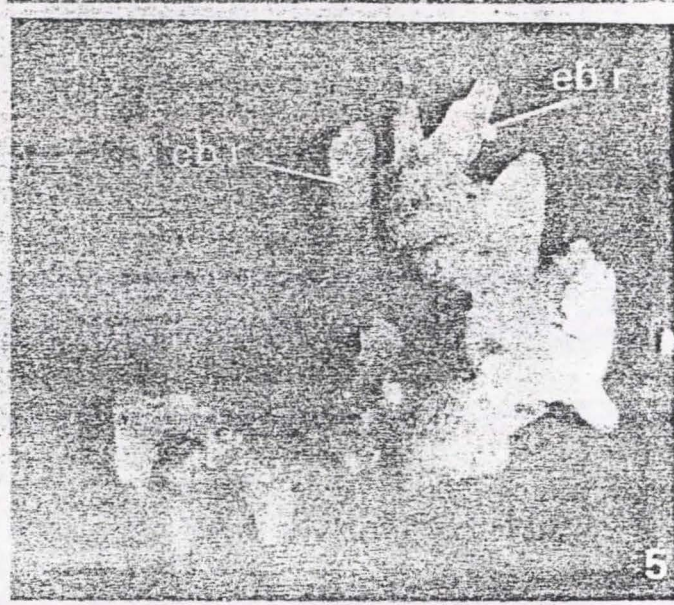
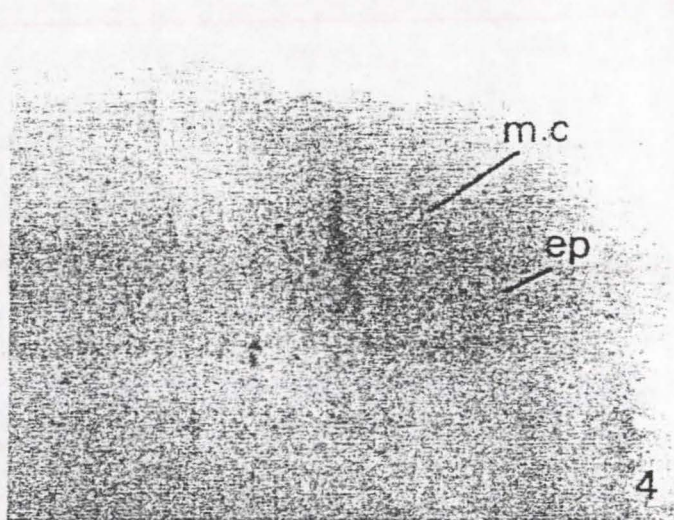
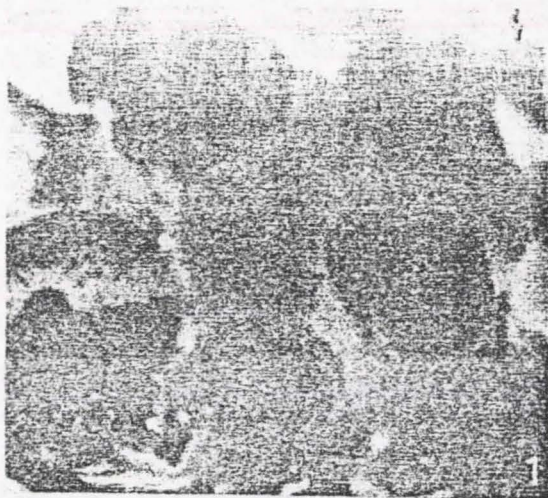


Planche XI: Initiation et développement des cals (suite).

1 et 2: Noircissement des cals sur des milieux appauvris en 2,4,5,T;
 3: Développement des racines (MS₂+2,4,5 T à 0,3 mg/l); 4: coupe
 dans un embryon de *M. acuminata*^b (2n=22); 5: Développement d'ébau-
 ches racinaires en milieu liquide agité; Coupe longitudinale dans
 une ébauche racinaire.
 eb.r.: ébauche racinaire; ep.:épiderme; m.c.: méristème caulinaire;
 ra.: racine.

En milieu liquide non agité, il nous a été possible d'entretenir des cultures issues de cals obtenus avec le 2,4,5 T (à 1 mg/l) pendant trois semaines sur un milieu contenant seulement de l'AIA (2 mg/l) et de la BAP (2 et 6 mg/l). Les périphéries des "disques" sont restées blanches puis ont manifesté un début de prolifération. La racine, par ailleurs, ne s'est pas développée. Ces cals ont été ensuite repiqués sur le même milieu solide au bout de 45 jours et ne croissent que très lentement, au cours des repiquages successifs, en conservant une teinte claire. Ils ne présentent ni rhizogénèse ni caulogénèse.

1-2-2-4 : Conclusions et discussion.

1-2-2-4₁ : Importance de la position et du choix de l'explant pour l'initiation de la callogenèse.

Les études sur la position de l'explant en culture, nous ont montré en premier lieu, que les proliférations ne peuvent apparaître qu'au niveau du contact des tissus avec le milieu. Cela sous-entend que les éléments de ce dernier ne migrent que très difficilement dans les tissus de l'explant et explique en particulier que l'on ait obtenu de meilleurs résultats avec ceux qui sont placés à plat (surface de contact maximale).

Nous n'avons pas vu de différence dans le comportement des cals d'origine interne selon qu'ils sont produits à partir de fragments de gaines prélevés soit sur des feuilles vertes, soit sur des feuilles de plantes étiolées, à l'inverse de ce que nous avons observé dans les essais préliminaires avec les cals d'origine superficielle. Cette différence est due, nous semble-t-il à ce que ces derniers étaient très sensibles à l'oxydation des phénols alors que les cals d'origine interne le sont beaucoup moins, cette oxydation étant liée à la présence ou non de 2,4 D et de 2,4,5 T dans le milieu - Cette dernière constatation semble confirmée, par ailleurs, puisqu'on peut entretenir les proliférations d'origine interne indifféremment à la lumière ou l'obscurité.

- En conséquence, que les tissus superficiels des explants prélevés sur des feuilles vertes noircissent plus rapidement que ceux appartenant à des plantes étiolées n'a pas d'importance sur la callogénèse des tissus internes à ce niveau de la feuille.

Toutefois, si pour les cals d'origine interne, obtenus sur milieu avec 2,4 D et 2,4,5 T, l'état physiologique de l'explant importe peu, il n'en est pas de même de son niveau de prélèvement. Nous avons constaté que la possibilité d'obtenir un cal dépendait grandement de la position de l'explant sur la feuille, l'initiation de la callogénèse étant en effet la plus forte au niveau de la gaine et surtout du pétiole (Fig.10).

Des études qui portent sur le développement de la feuille de bananier in vivo de cv. " Gros Michel " (SKUTCH, 1930; BARKER, 1962) ont montré que la croissance intercalaire de la jeune feuille est maximale dans la partie supérieure de la gaine, le pétiole et la base du limbe et qu'elle diminue progressivement à mesure que l'on se rapproche du sommet de la feuille, pour être nulle dans sa partie distale, cette dernière étant mise en place très tôt au cours du développement.

Ainsi, il est possible de corréler la capacité de prolifération des explants de feuille in vitro avec les zones de multiplication cellulaire dans cet organe, à condition que l'on admette que le développement des feuilles soit identique in vivo et in vitro, ce qui n'est pas improbable. Des résultats semblables ont déjà été obtenus par d'autres chercheurs : WERNICKE et coll. (1982) ont montré sur des fragments de feuilles de Sorgho qu'il existait une relation évidente entre l'index mitotique in vivo et la réponse callogène des tissus in vitro.

De surcroît les cellules des couches superficielles de la feuille ne prolifèrent pas et finissent par dégénérer. Cette nécrose est très marquée au niveau du limbe et beaucoup moins au niveau de la gaine et du pétiole où la

Proportion relative des tissus conducteurs est beaucoup plus forte que dans le limbe. Il est vraisemblable que les parties mortes de la feuille créent un milieu toxique et freinent ainsi la callogenèse d'origine interne; cette hypothèse pourrait expliquer en l'occurrence le fort ralentissement de l'initiation des cals observé dans la partie basse des limbes (zone 2 et 3).

Finalement, c'est par une sélection rigoureuse du matériel végétal, c'est à dire, en ne mettant en culture, toujours à l'obscurité, que des explants prélevés au niveau du pétiole, déposés à plat, face dorsale contre le milieu, que nous avons pu augmenter significativement la fréquence d'explants présentant au moins un cal. En effet, le taux qui variait de 15 à 20 % lors des expériences préliminaires où ni la nature de l'explant ni sa position n'étaient précisées est devenu proche de 100 % dans les dernières expériences réalisées avec 2,4 D ou 2,4,5 T à 1 mg/l. De plus, l'amélioration de la callogenèse tient plus à un choix judicieux du matériel végétal, qu'à une modification des milieux puisque aucune des combinaisons testées ultérieurement ne s'est avérée meilleure pour l'instant que celle utilisée initialement (pour le 2,4 D comme le 2,4,5 T).

1-2-2-4₂ : Etude de la callogenèse.

- analyse du développement du cal.

Avant d'étudier le développement du cal il nous est apparu nécessaire de préciser que la quasi totalité des cals obtenus sur des feuilles de Monocotylédones en général, l'ont été avec des milieux proches des nôtres, à savoir une formule saline souvent dérivée de MS et, par ailleurs, l'emploi du 2,4 D ou du 2,4,5 T comme seul régulateur de croissance. Cette précision est importante, car elle nous permet de comparer plus facilement nos travaux à ceux qui ont été faits par d'autres auteurs dans ce domaine.

L'analyse comparée de l'anatomie de la feuille in vitro (témoin de mise en culture) et de celle in vivo nous a montré en premier lieu qu'il n'y avait pas de modifications importantes des tissus entraînés par le passage des plantes in vitro, si ce n'est l'absence de cuticule sur l'épiderme supérieur de la feuille et les formes modifiées des cellules sous épidermiques et chlorophylliennes. Ces dernières qui sont allongées in vivo sont, à l'inverse arrondies in vitro. Peut-être cela est-il dû à ce que le tissu assimilateur n'est pas fonctionnel, les sucres étant apportés par le milieu à la plante ? Ceci n'est, bien entendu qu'une hypothèse. Ces travaux doivent être l'objet d'une étude comparée plus précise en différents points du limbe et si possible sur le même cultivar dans les deux conditions de culture.

L'étude histologique du développement du cal que nous avons fait sur le bananier, nous a permis de montrer que ce sont les seules cellules proches des vaisseaux libéro-ligneux qui entrent en division. L'initiation de la callogenèse débute toujours de la même façon : des cellules dont le cytoplasme devient dense, gonflent puis se cloisonnent.

Cette observation a déjà été effectuée sur d'autre plantes telles que le Palmier à huile (AHEE et coll., 1981) ou le Sorgho (WERNICKE, 1982) avec le 2,4 D. Par contre, en utilisant cette même auxine, BONNEL et coll.(1983) sur la Canne à sucre, ont montré que l'ensemble des tissus foliaires participaient à la formation du cal. Il semblerait que chez la plupart des Monocotylédones toutes les cellules de la feuille ne puissent pas se différencier et devenir méristématiques, et que cette possibilité soit réservée aux cellules proches des faisceaux (WERNICKE, 1981).

En fait, cette hypothèse doit être nuancée et ne peut se vérifier, aux exceptions près, que dans le cas de l'utilisation de certains régulateurs de croissance comme le 2,4 D ou le 2,4,5 T. En effet, nous avons, chez le bananier, obtenu des proliférations d'autres tissus au cours des essais préliminaires en employant d'autres substances.

La séquence des étapes qui mènent d'un petit massif méristématique vers un cal adulte est toujours identique. Elle est le résultat de l'expression d'un programme de développement et surtout pas d'une prolifération cellulaire anarchique. En conséquence, cette évolution de la callogenèse mène vers de véritables " culs de sac " morphogénétiques les cals n'évoluent plus au cours des repiquages qu'en reproduisant indéfiniment les mêmes structures. Ce type de prolifération a déjà été décrite par d'autres auteurs.

En effet, il apparaît actuellement que les cals de céréales ne sont autres que des cultures aberrantes de racines plus ou moins différenciées plutôt qu'une population uniforme de cellules totipotentes dédifférenciées (KING et coll., 1978; CURE et MOTT, 1978).

Par ailleurs, les cals obtenus avec le 2,4 D, qui ne manifestent pas de différenciations racinaires mais présentent bien la même organisation générale que ceux obtenus avec le 2,4,5 T, semblent n'être que des formes incomplètes du développement des cals derniers cités. Le 2,4 D paraît alors moins efficace que le 2,4,5 T pour mener à terme le développement du cal vers un cul de sac morphogénétique.

- à propos d'embryogenèse somatique :

L'apparence des cals obtenus avec le 2,4,5 T, et plus particulièrement l'organisation caractéristique de "disques" a retenu toute notre attention. En effet, nous avons été tenté d'assimiler la structure de "disque" dont le centre est occupé par un pôle racinaire bloqué à celle d'un embryon zygotique de bananier, avec un cotylédon en forme de plateau évidé qui se prolonge en son centre par un corps cylindrique contenant l'extrémité radiculaire.

Compte tenu de la méthodologie employée (utilisation de fragments foliaires et de régulateurs de croissance tels que le 2,4 D ou la 2,4,5 T), la production d'embryons somatiques dans les cultures paraissait être une hypothèse plausible.

L'analyse histologique a permis de lever toute ambiguïté. En effet, les coupes anatomiques que nous avons faites dans un embryon somatique de Musa acuminata (AA), nous ont permis de constater que, d'une part, il existe une continuité entre la radicule et la gemmule et que, d'autre part, l'embryon est entièrement recouvert par un épiderme (Pl.XI.4). Or nous n'avons observé, sur les disques obtenus avec le 2,4,5 T (à 1mg/l), ni méristème caulinaire en relation avec l'ébauche de racine ni, surtout, d'épiderme général les entourant, la présence de ce tissu de revêtement étant une caractéristique nécessaire mais pas suffisante pour définir un embryon qu'il soit zygotique ou somatique.

- Récemment, CRONAUER et coll. (1983) ont déclaré avoir obtenu des "embryoïdes" sur deux cultivars de bananier " Pelipita (ABB) et Saba (ABB). Des cormes provenant de plantes in vitro ont été sélectionnés et mis en culture liquide agitée, dans des milieux dont la composition de base est proche de celle de MS, mais avec addition d'eau de noix de coco (5 % v/v), de 2,4,5 T (1 mg/l) et de BAP (1 mg/l).

Une suspension cellulaire isolée de cette culture initiale, a été transplantée dans le même milieu au bout de 8 à 24 jours selon le clône. Après 5 semaines (à peu près) de culture, des "embryoïdes" sont apparus dont l'auteur indique qu'il a obtenu le développement de la racine mais jamais de la tige.

Nous avons répété cette expérience en mettant en culture, dans le même milieu, des fragments de gaines foliaires prélevés sur des plantes de cv. "Américani" (AAA) cultivées in vitro. Après 2 mois de culture nous avons isolé

des structures portant une masse cellulaire à leur base (Pl.XI.5) dont la forme ressemble à celle décrite par CRONAUER et coll. L'étude cytologique de ces structures nous a montré que ce n'étaient pas des embryoïdes, mais des ébauches de racines en tous points identiques à celles obtenus en milieu solide avec le 2,4,5 T (à 1 mg/l)(Pl.XI.6).

1-2-2-4₃ : Essais de traitements caulogènes.

Tous les traitements qui auraient pu promouvoir la caulogénèse ont échoué, parce qu'il n'est pas possible de baisser suffisamment ou de supprimer complètement la quantité de 2,4 D ou le 2,4,5 T du milieu, sans que les cals^{ne} se nécrosent. En conséquence, que l'on rajoute ou non des cytokinines ou d'autres auxines, on ne peut obtenir une autre forme de callogenèse que celle donnée par le 2,4 D et le 2,4,5 T. Il est intéressant de constater que ces cals réagissent alors, vis à vis de la nécrose, de la même façon que ceux issus des tissus superficiels obtenus lors des essais préliminaires.

Le cal friable obtenu avec le 2,4 D (à 0,5 mg/l) et entretenu sur le même milieu, est peut être une voie de recherche intéressante puisque c'est sur ce type de cal que AHEE et coll. (1981), sur le palmier à huile, ont obtenu des embryons somatiques.

Enfin, la possibilité d'obtenir en milieu non agité, une nouvelle callogenèse initiée sur le bord de "disques" obtenus avec le 2,4,5 T offre une voie possible de recherches pour obtenir une éventuelle caulogénèse. Il est remarquable que la culture en milieu liquide permette d'obtenir des nouveaux cals sans que le milieu ne contienne ni 2,4 D, ni de 2,4,5 T. Il est possible que les cellules cibles soient touchées plus rapidement en milieu liquide et

entrent en mérisis avant que la nécrose n'ait touché l'ensemble des tissus. Ces cals possèdent des caractéristiques nouvelles, puisqu'ils peuvent être repiqués sur des milieux solides ne contenant que de l'AIA et de la BAP sans noircir. Il s'est vraisemblablement opéré dans ces cals produit à la périphérie du disque une sélection des cellules dont le métabolisme et la sensibilité à l'égard de l'oxydation des phénols ont été modifiés.

Actuellement ces cals sont entretenus sur des milieux ne contenant que de l'AIA (2 mg/l) et de la BAP (2 à 6 mg/l) mais ils ne prolifèrent que très lentement.

1-2-2-4₄ : En conclusion.

Les explants foliaires, prélevés sur des plantes cultivées in vitro présentent, au premier abord, de nombreux avantages :

- le matériel qui est rajeuni par le passage des plantes en culture in vitro possède, à priori, de bonnes aptitudes à la callogenèse d'autant plus que chez le bananier, il n'est pas possible d'initier des cals à partir d'embryons (matériel végétal morphogénétiquement très jeune) comme c'est le cas pour de nombreux autres travaux, puisque on retrouve des graines en quantité importante que sur les bananiers séminifères diploïdes. Ces derniers présentent peu d'intérêt actuellement pour l'extension de la variabilité par culture de tissu (Nous examinerons ultérieurement les possibilités de callogenèse offertes par des explants prélevés au niveau de l'inflorescence).

- Par ailleurs, la production de cals à partir de feuilles et non de tiges, est une garantie absolue contre l'éventuel risque de promouvoir le développement de méristèmes préexistants portés par l'explant, ce qui n'est pas notre objectif étant donné que l'on recherche une méthode de culture qui élargissent la variabilité.

- Enfin, les explants foliaires sont une source de matériel, relativement homogène, stérile, que l'on peut obtenir, à tout moment en grande quantité.

En fait l'intérêt d'utiliser ce matériel est très limité puisque, dans l'état actuel des travaux, les manipulations possibles sur les types de cals obtenus sont réduites, et il y a peu d'espoir pour l'instant d'obtenir, à brève échéance, une caulogénèse. Il faut signaler à ce titre, que les cals apparus avec le 2,4 D (à 0,5 mg/l) ou ceux avec seulement de l'AIA et de la BAP, isolés après un passage en milieu liquide pourraient présenter des formes intéressantes, voir des voies de recherche possibles pour des travaux ultérieur de callogénèse à partir d'explants foliaires.

2 - Callogenèse et organogénèse de tissus floraux et inflorescentiels.

Dans cette partie de notre travail, notre but a été de voir si, comme nous l'avons fait en particulier avec les fragments de feuilles prélevés sur explants *in vitro*, et pour les mêmes raisons déjà exposées (cf.p.19) il était possible, à partir de tissus floraux ou inflorescentiels de plantes *in vivo*, d'obtenir des cals, et ensuite, sur eux, des néoformations caulinaires.

Compte-tenu, avec ce dernier matériel végétal, du nombre important de tissus différents à tester, nous avons choisi d'utiliser une gamme restreinte de milieux (tableau II) inspirés des résultats déjà obtenus par d'autres auteurs pour l'induction de la callogenèse chez le bananier (MOHAN RAM et coll., 1964) et plus généralement, sur le comportement d'explants de Monocotylédones en culture de tissus (HUNAULT, 1979). Sur ces milieux, nous nous sommes attachés à définir la nature et le stade de développement optimal du matériel végétal qui nous permettent de produire un cal.

Dans un premier temps, nous présenterons les résultats que nous avons obtenus à la suite de tests préliminaires, qui ont constitué en la mise en culture systématique de tous les tissus sur un petit nombre de milieux (tableau VIII). A l'issue de ces travaux, des cals ont été produits qui, comme nous le verrons ultérieurement, n'ont pas donné de résultats particulièrement intéressants; aussi, ces derniers seront présentés dans leur ensemble, sans que trop de détails, n'y soient apportés.

Nous verrons comment, dans un deuxième temps, des cals sont apparus assez fortuitement d'ailleurs, sur du matériel inflorescentiel. Ceux-ci, par contre, ayant présenté des caractéristiques intéressantes, ont fait l'objet d'un travail plus approfondi et les données obtenues à leur sujet seront présentées avec plus de précision.

2-1 : Tests préliminaires : mise en culture des divers tissus floraux et inflorescentiels.

2-1-1 : Cultures initiales : influence du milieu de culture et du matériel végétal utilisés.

Ayant remarqué, là encore, que les cultures, placées à la lumière, avaient très vite tendance à se nécroser, et, en tout cas, présentaient des réponses beaucoup plus lentes que celles placées à l'obscurité, nous avons mis tous nos explants à l'obscurité.

Les résultats sont consignés dans le tableau VIII.

- Sur le milieu témoin (MSb*), dépourvu de régulateur de croissance, aucun cal n'est apparu au bout de 45 jours de culture, quel que soit l'explant utilisé (Pl.XII-1, et tableau VIII).

- A l'inverse, l'utilisation de 2,4 D à une concentration de 1 mg/l provoque une callogenèse sur la presque totalité des explants étudiés. Celle-ci est importante sur les fragments d'ovaires (Pl.XII 2 et 3) et les anthères mais beaucoup moins sur les autres explants floraux ou inflorescentiels (Pl. XII-6 et tableau VIII).

Sur les tranches d'ovaires prélevées sur des fleurs "femelles" situées dans la portion de l'inflorescence au stade femelle (cf.p. 4), des cals friables se forment uniquement à partir des tissus de l'endocarpe (Pl.XII.3) alors qu'ils apparaissent, à la fois sur l'ectocarpe (aspect friable, translucide, de couleur grisâtre et sur les tissus plus internes (aspect friable mais de couleur blanche et moins translucide) avec les fragments d'ovaires de fleurs "males" (Pl.XII.2.).

- Nous avons noté également, que les cals portés par les anthères sont initiés à partir des tissus superficiels de celles-ci et qu'avec les bractées,

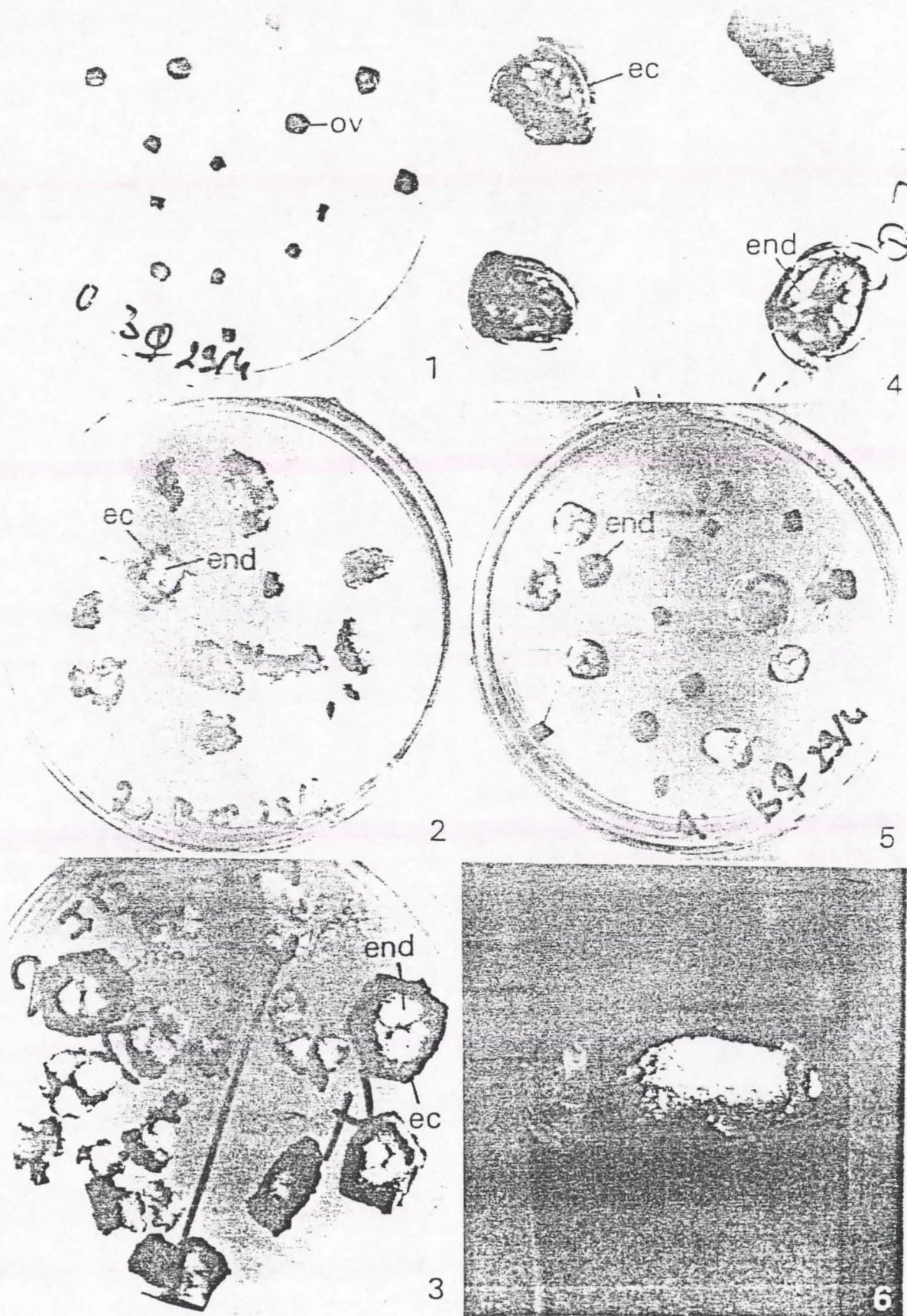


Planche XII : Tests préliminaires: callogénèse à partir de différents tissus floraux et inflorescentiels

1 à 5: Mise en culture de tranches de fleurs ou .1: aucun cal n' est apparu sur MS*; 2 à 5: cal plus ou moins important (2) à partir de fleurs ♂ sur $MS^*+2,4D$ (1 mg/l); (3) à partir d'explant de fleur ♀ sur $MS^*+2,4D$ (1 mg/l); (4) à partir d'explant de fleur ♀ sur MS^*+ANA (10 mg/l); (5) à partir de fleur ♂ sur MS^*+ANA (1 mg/l)+BAP (1 mg/l).

6: Mise en culture de fragment d'axe inflorescentiel sur $MS^*+2,4D$ (1 mg/l).
ec.: ectocarpe; end.: endocarpe; me.: mésocarpe; ov.: ovaire.

Tableau VIII: Intensité de la prolifération en fonction de l'explant et du milieu utilisés (au bout de 45 jours de culture à l'obscurité).

		MS [*] _b témoin	MS [*] _b + 2,4D (en mg/l)			MS [*] _b + ANA (en mg/l)			MS [*] _b + ANA (1mg/l) + BAP (en mg/l)		
			0,1	1,0	10,0	0,1	1,0	10,0	0,1	1,0	10,0
Sections d'ovaires de fleurs femelles	ectocarpe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	mésocarpe et/ou endocarpe	-	-	++	+	-	+	++	+	+	+
Sections d'ovaires de fleurs mâles	ectocarpe	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-
	mésocarpe et/ou endocarpe	-	-	++	+	-	+	++	+	+	+
Anthères (âgées)		-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Bractées (jeunes)		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Fragments d'axe inflorescentiel		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Pistil + stigmate		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Tépales		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

. - : aucune prolifération; + : début de prolifération; ++ : prolifération importante.

à l'inverse de ce que nous avons vu sur les fragments de feuilles, c'est l'ensemble des tissus qui entre en prolifération. Les explants cultivés sur un milieu n'ayant qu'une faible quantité de 2,4 D (0,1 mg/l) se comportent comme ceux placés sur le milieu témoin; avec des concentrations plus élevées (10 mg/l), les cals apparaissent plus vite mais noircissent rapidement et ne tardent pas à se nécroser.

- En présence d'ANA dans le milieu, seuls, les tissus d'ovaires présentent des proliférations. Ces dernières, toutes initiées à partir des tissus du méso- et/ou de l'endocarpe sont compactes, de couleur blanc-crème avec les tranches d'ovaire de fleurs mâles; sur celle de fleurs femelles, on observe le développement de structures "en boule" (Pl. XII-4) à partir des paroi carpellaires du côté de l'explant en contact avec le milieu. Ces boules, lorsqu'elles ont atteint une taille suffisante (au bout de 90 jours) éclatent et libèrent un cal blanc, abondant et très friable. Avec cette auxine, il semble que la concentration de 10 mg/l soit la meilleure pour l'obtention de ce type de callogenèse.

- L'association ANA (1 mg/l) + BAP à différentes concentrations (0,1; 0,5; 1 mg/l) ne modifie pas le comportement des fragments d'ovaires. Ceux-ci se développent comme en présence d'ANA seul, mais peut être un peu plus rapidement (Pl.XII.5).

Les résultats présentés ci-dessus ont été obtenus avec des bananiers de la série "Cavendish". Nous avons pu constater, par ailleurs, que la vitesse de réaction des explants dépendait là encore du génotype. Ceux de bananiers diploïdes (AA) réagissent apparemment moins vite que ceux de la série "Cavendish" (AAA) et les réponses les plus lentes sont notées chez ceux possédant le génome B (AAB ou BB), la présence de phénols en quantité plus importante entraînant la perte de la quasi totalité des explants au bout d'une période plus ou moins longue.

Nous avons pu également remarquer, que le stade de développement de l'inflorescence, et par suite, de ses fleurs, influe sur la callogenèse. Ainsi, seule les anthères âgées (6-8 mm de hauteur) et les bractées jeunes (5 cm de haut) qui ne présentent pas encore de traces de pigmentation, produisent des ca's avec le 2,4 D. A l'inverse, pour les ovaires de fleurs "femelles" et de fleurs "mâles", les réactions semblent indépendantes du rang d'insertion sur l'inflorescence de la main où ils ont été prélevés.

2-1-2 : Repiquage des cals et essais de traitements susceptibles de provoquer des néoformations caulinaires.

Seuls ont été repiqués, les cals bien développés, c'est à dire, principalement, ceux issus d'ovaires (quelque soit le milieu d'origine) et parfois aussi, ceux d'anthères initiés avec le 2,4 D.

En maintenant les mêmes milieux, les cals, une fois repiqué, continuent à se développer, sans modification de leur aspect à chaque repiquage, qui a lieu tous les 45 jours.

Nous avons aussi essayer de provoquer l'apparition d'une organogénèse sur ces cals.

- Une partie des cals a été transférée sur le milieu de base : alors que les cals issus d'anthères ont noirci puis sont morts, ceux d'ovaires, provenant de milieux contenant du 2,4 D ou de l'ANA (avec ou non de la BAP) gardent une teinte blanche, restent friables mais ne croissent que très lentement.

- L'augmentation progressive de la quantité de BAP (0,1; 0,5 et 1 mg/l) au cours des repiquages en maintenant la concentration de 2,4 D à 1 mg/l dans le milieu, ne modifie pas l'aspect des cals.

- Nous n'avons jamais observé sur ces cultures de tissus, le moindre phénomène d'organogenèse qu'elle soit racinaire ou caulinaire.

Devant le peu de résultats obtenus avec ce matériel végétal nous n'avons pas jugé utile de pousser plus loin nos investigations.

2-2 : Développement de cals à partir d'explants inflorescentiels plus complexes.

Dans un deuxième temps nous allons nous intéresser aux cals qui sont apparus sur les fragments d'apex inflorescentiels, après section longitudinale ou transversale de ces apex.

Au cours de ce travail, nous avons essayé, aussi souvent que cela nous a été possible, de relier les observations morphologiques à une analyse histologique du matériel.

2-2-1 : Initiation des cals.

Ainsi que nous l'avons déjà signalé (cf.p.66), des proliférations se sont développées sur les fragments d'apex inflorescentiel . Ainsi lors du repiquage de ces explants sur le milieu MSb* (cf.fig.8) un cal s'est développé à la lumière, à la base d'un ovaire isolé de fleur mâle.

Cet explant provenait d'une inflorescence du cv. "Grande Naine" cultivée, au préalable, à l'obscurité, sur un milieu contenant de l'ANA et de la BAP (à 1 mg/l).

Ce cal apparaît comme étant constitué, essentiellement, par un ensemble de petites "nodosités" compactes, blanches, très opaques, de 0,5 mm de diamètre environ. L'apparition de ce type de cal n'a pas été un fait unique : en effet, des proliférations, d'aspect identique, ont pu être isolées, aussi, à la base de

réversions vraies de boutons floraux, après que celles-ci furent isolées et repiquées sur MSb^{*}, avec l'espèce M.acuminata zabrina (AA) et le cultivar "901", toujours à la lumière(Pl.XIII.1).

Des proliférations d'aspect semblable mais dont les "nodosités" étaient un peu plus grandes, se sont développées, ensuite, sur des explants inflorescentiels (du cv. "Grande Naine") lorsque ceux-ci ont été transférés du milieu MSb^{*} A₄B₄ (cf.fig.8) mais aussi sur des explants (du cv. "901") mis directement en culture sur le milieu MS^{*} A₂K₂ (MSb^{*} + AIA (2 mg/l) + K (2mg/l)). Le plus souvent, ces cals apparaissent au niveau de la jonction des fleurs "mâles" sur l'axe inflorescentiel et parfois sur les autres tissus floraux qui ont subi une forte activation.

Par ailleurs, aucune prolifération de ce type n'a été notée sur les tissus inflorescentiels de l'espèce sauvage M.balbisiana (BB) et sur ceux de plantains (AAB).

Enfin, nous tenons à signaler, que la forme des cals que nous venons de décrire ci-dessus, surtout pour celle dont les "nodosités" sont assez petites (sur milieu MSb^{*}), n'est pas sans rappeler celle que nous avons déjà observé sur des fragments de feuilles, placées sur le milieu contenant du 2,4 D.

2-2-2 : Croissance des cals.

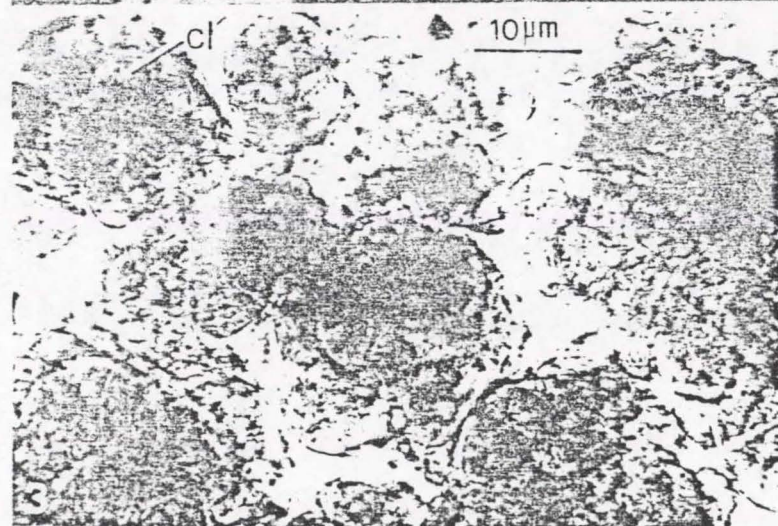
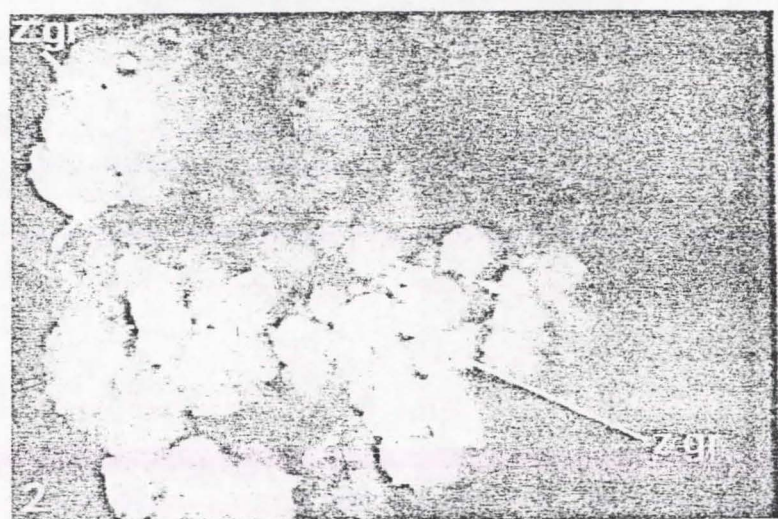
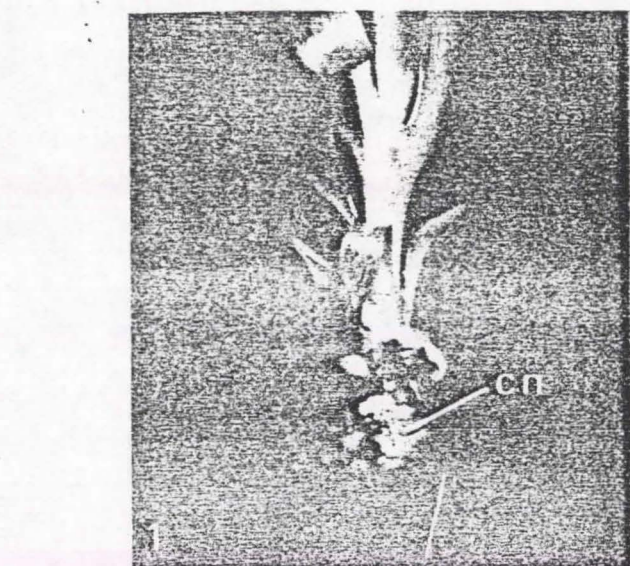
Les cals, que nous avons initialement obtenus sur le milieu MSb^{*} et qui présentent une croissance rapide, ont été isolés et repiqués, pour une part, sur le même milieu^{et} pour la partie restante sur un milieu MS^{*} A₂B₂ (MSb^{*} + AIA (2 mg/l) + BAP (2 mg/l)) où ils acquièrent une morphologie un peu

différente. Sur ce dernier milieu, il est possible, en général, 30 à 45 jours après le repiquage, sur les proliférations en pleine activité, de remarquer deux zones contiguës, d'apparence distincte (Pl.XIII-2).

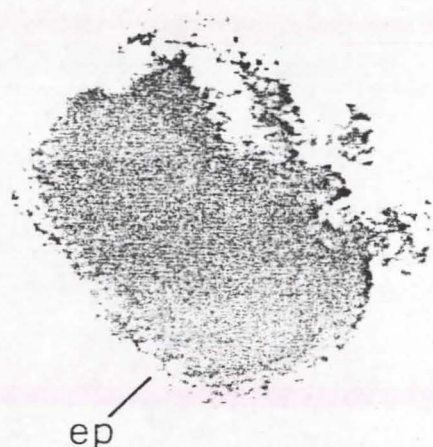
- La première que nous appellerons zone de prolifération (z.pr.), est constituée d'un ensemble de "nodosités", d'aspect identique à ceux que nous avons déjà décrits mais de tailles très variables (variant de 0,5 à 2 mm de diamètre). L'observation au microscope de matériel prélevé dans la zone de prolifération et monté dans une goutte de carmin acétique entre lame et lamelle, révèle que, en premier lieu, des amas cellulaires, issus du recloisonnement d'une seule cellule initiale, s'individualisent (Pl.XIII-3). Par ailleurs, nous avons trouvé aussi dans cette zone, des structures bien individualisées apparemment portées en contiguité les unes des autres par le cal, et constituées d'un ensemble de cellules homogènes, strictement délimité, semble-t-il, par un épiderme (Pl.XIII-4).

Des coupes histologiques faites dans une "nodosité" dans la zone de grandissement, ont montré que l'ensemble des tissus internes, dans lequel on distingue un début de différenciation cellulaire, est en continuité. La bordure externe de ces "nodosités", qui sont strictement délimitées par un épiderme, présente de nombreuses circonvolutions, ces dernières paraissant dûes, au développement de nouvelles "nodosités" sur les plus anciennes (Pl.XIII-5).

Ainsi ces proliférations apparaissent, après plusieurs repiquages, comme étant constitués d'un ensemble très hétérogène de "nodosités", toutes issues les unes des autres mais à des stades de développement très différents. Chacune d'elles, lorsque la croissance sera achevée, redonnera des structures identiques à elle-même.



4



5

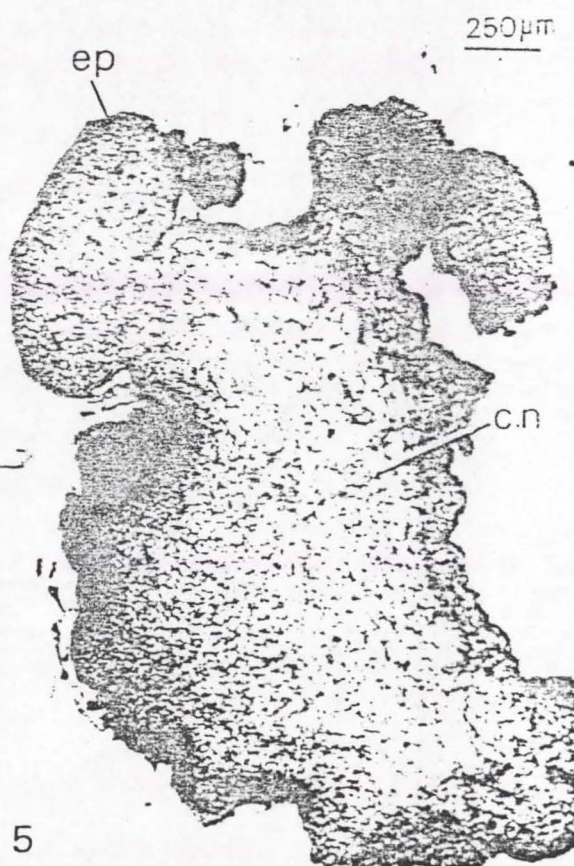


Planche XIII : Développement des cals portant des nodosités originaires des explants inflorescentiels.

- 1: Apparition d'un cal à la base d'une réversion de *M. acuminata* (AA) (milieu MS*); 2: Développement des cals (milieu MS*_{A2B2}); 3: Individualisation des cellules et recloisonnement dans la zone de prolifération (milieu MS*_{A2B2}); 4: Nodosité individualisée dans la zone de prolifération (milieu MS*_{A2B2}); 5: Coupe histologique faite dans la zone de grandissement (milieu MS*_{A2B2}).
 cl.: cloison; c.n.: cal à nodosités; ep.: épiderme; z.gr.: zone de grandissement; z.pr.: zone de prolifération.

Il est à noter que la structure des cals obtenues sur les explants placés sur les milieux $MS^* A_2 K_2$ et $MS^* A_4 B_4$ est identique à celle que nous venons de décrire.

2-2-3 : Description des différentes modalités d'organogenèse observées sur ces cals. (Pl. XIV et XV).

Seuls les cals entretenus sur le milieu $MS^* A_2 B_2$ (et uniquement sur ce milieu) ont manifesté différentes modalités d'organogenèse que nous allons maintenant décrire. Celles-ci, compte tenu des résultats en notre possession, semblent être différentes selon qu'on s'adresse à des proliférations récentes ou anciennes, c'est-à-dire à des "nodosités" en début de croissance ou complètement développées.

- Sont apparues, sur un petit nombre de cals, des formations foliacées (f.f.) à la surface des "nodosités". Celles-ci, souvent en forme d'écailles, de très petite taille (de 1 à 3 mm de haut environ), sont très translucides et de couleur beige ou vert pâle. Leur mode d'insertion semble dépendre du stade de développement des "nodosités".

Nous avons observé, sur un cal initié depuis 4 mois à partir d'un explant inflorescentiel du cv. "901" mis en culture sur le milieu $MS^* A_2 K_2$, et repiqué à la lumière depuis 45 jours sur le milieu $MS^* A_2 B_2$, que les formations foliaires s'insèrent très régulièrement en couronne à la surface des "nodosités" de petites tailles (1 à 2 mm de diamètre). Par ailleurs, sur l'une d'entre-elles, des feuilles vertes se sont développées (Pl. XIV-1,2). Une étude histologique, actuellement en cours sur ce matériel laisserait supposer que dans certains cas, des méristèmes caulinares sont présents au centre de la couronne foliaire.

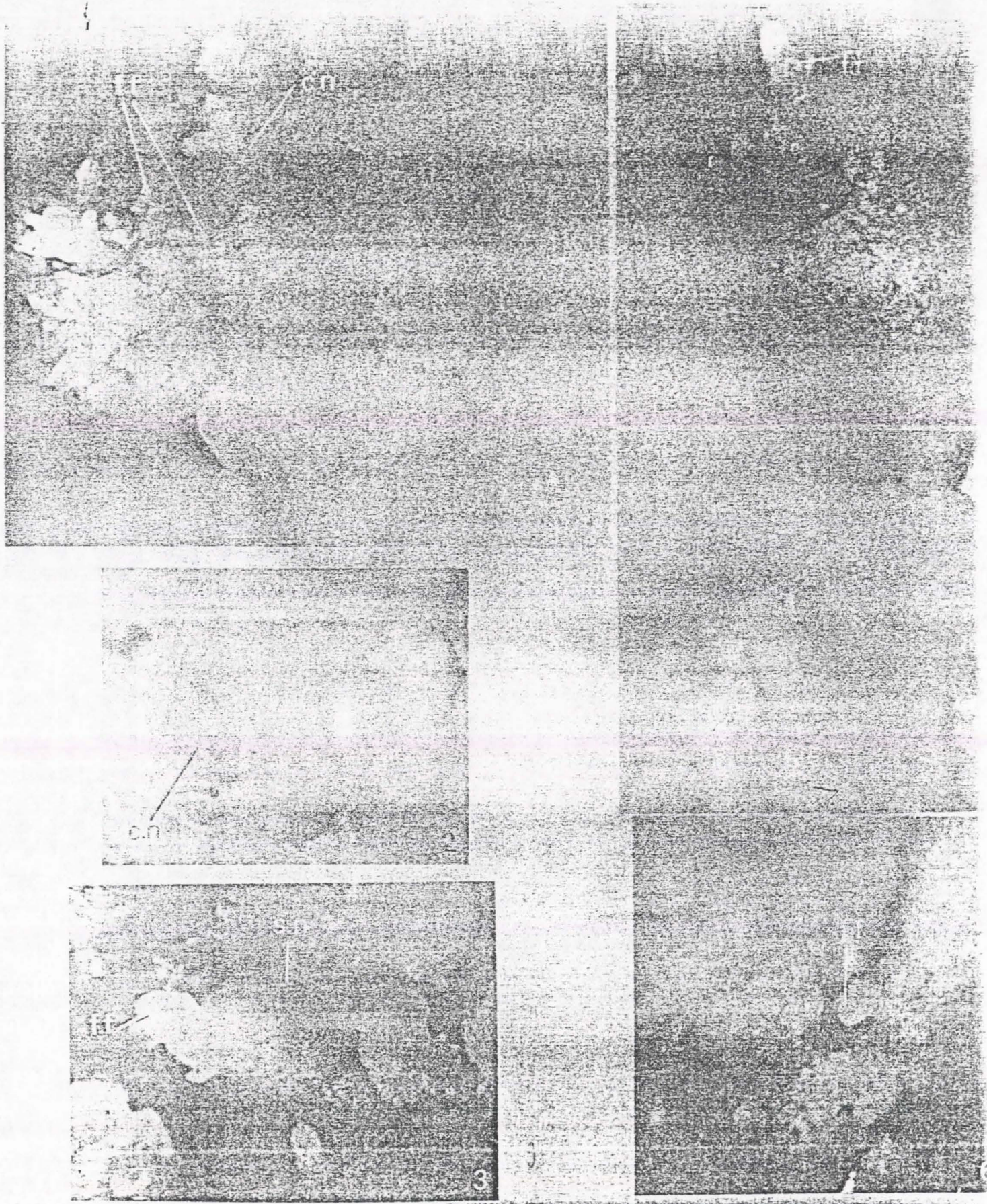


Planche XIV : Organogénèse sur les cals d'origine inflorescentielle
(milieu MS^{*}_{A2B2}).

1 - 2: Développement de formations foliaires à la surface des nodosités apparues depuis peu de temps; 3-4-5-6: Différenciations foliacées à la surface des nodosités apparues sur des cals en culture depuis plus d'un an.

c.n.: cal avec des nodosités; f.f.: formation foliacées; f.v.: feuilles vertes; s.n.: surface des nodosités.

Sur un cal du cv. "Grande Naine", entretenu depuis plus d'un an sur le milieu $MS^*A_2B_2$ (première prolifération apparue sur MSb^*), il s'est également développé sur les "nodosités" de grande taille (5mm de diamètre environ) des formations foliacées mais de façon complètement désordonnée et de formes beaucoup plus variables que précédemment. En effet, elles sont plus ou moins allongées selon les cas (Pl.XIV-3); et sont, parfois, portées par des petits axes (Pl.XIV-4,5 et 6). Alors que dans le cas précédent, des petites feuilles continuent à se développer, ici, elles restent bloquées à l'état d'ébauches et finissent par se nécroser.

L'isolement et le repiquage de ces formations avec la "nodosité" qui les porte, dans un milieu MSb liquide agité, n'a pas permis de lever ce blocage.

Les coupes histologiques faites sur ce dernier matériel, montrent que les formations foliaires s'insèrent en continuité avec le reste de la "nodosité" mais qu'on ne trouve pas de méristème caulinaire (Pl.XV- 1 et 2).

- Par ailleurs, sur ce même cal, et sur quelques autres, nous avons pu observer le développement de pousses feuillées, initiées, semble-t-il, à la suite de la prolifération limitée et uniforme des tissus superficiels des "nodosités". Les premières feuilles qui apparaissent, sont en forme de cupule, très opaques, épaisses et de couleur verte (Pl.XV.3), les suivantes se développent, au centre des premières, selon une morphologie classique.

Sur l'une des plantes que nous présentons, une racine s'est développée entre la première et la deuxième feuille ébauchée. Pour l'instant nous n'avons obtenu qu'une dizaine de plantes de ce type sur toutes nos cultures. Des coupes histologiques, faites sur l'une d'entre-elles, montrent qu'un méristème

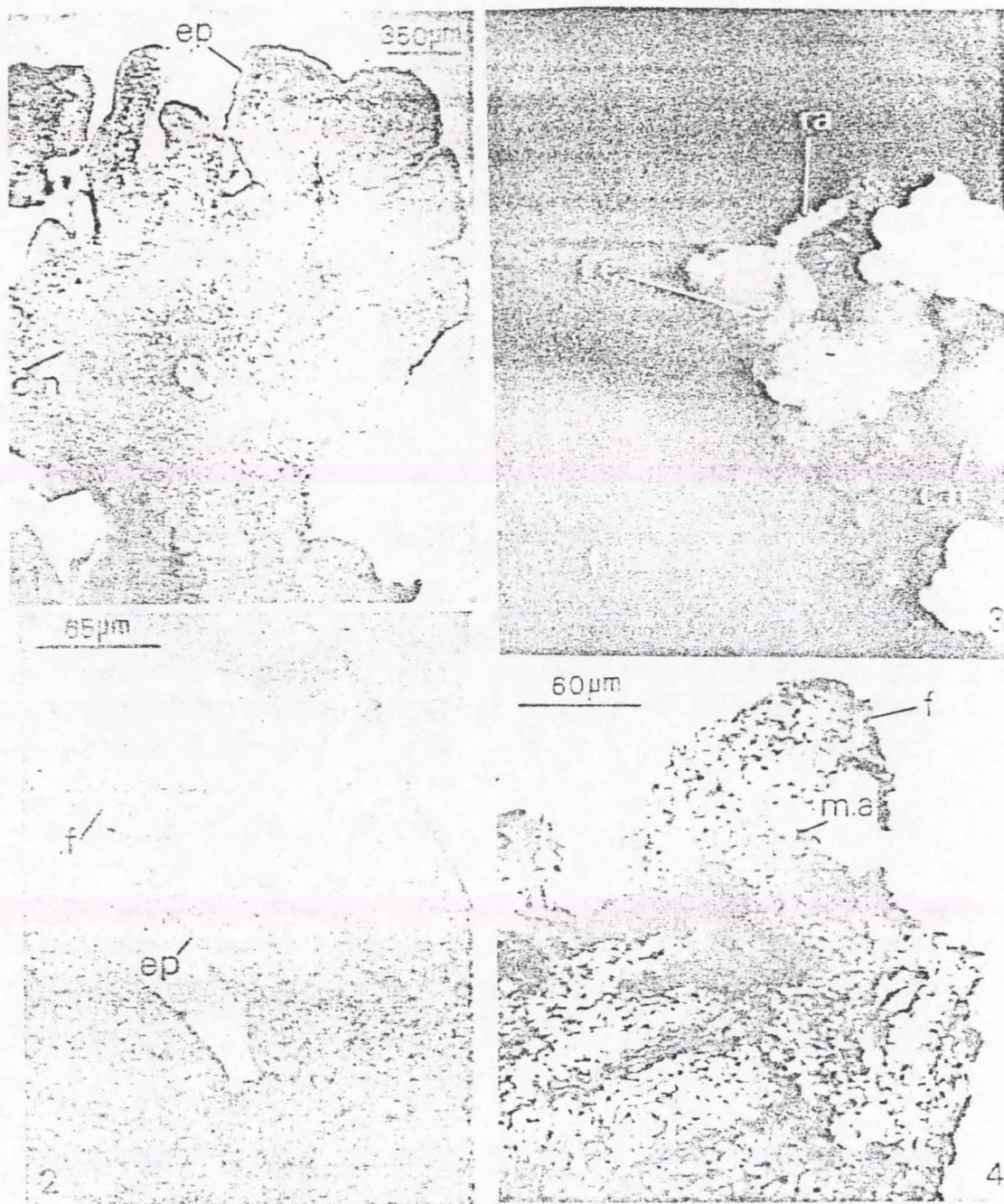


Planche XV : Organogénèse sur les cals d'origine inflorescentielle
(milieu MS*_{A2B2}) (suite).

1-2 : Coupe histologique à travers les formations foliaires portées par les nodosités développées; 3: Néoformation caulinaires à la surface d'un cal; 4: Coupe histologique passant par l'une de ces néoformations.

c.n.: cal à nodosités; n.: nodosité; ep.: épiderme; f.: feuille; f.f.: feuille en cupule; f.f.: formation foliacées; m.a.: meristème apical; ra.: racine.

apical est présent à l'extrémité, et que ces plantes sont en continuité avec le reste du cal (Pl.XV-4). Les autres ont été isolées et repiquées sur le milieu MSb. Elles se sont développées normalement et n'ont montré aucune modification, décelable in vitro. Nous n'avons pas fait pour l'instant de comptages chromosomiques.

Enfin, nous n'avons jamais observé de rhizogenèse directe sur ces cals et avons noté qu'ils ne noircissent pas en présence de fortes concentrations de cytokinines dans le milieu.

Afin d'essayer d'augmenter le taux de caulogenèse sur les proliférations en culture depuis plus d'un an, d'autres combinaisons de régulateurs de croissance ont été testées (MSb^{*}; MS^{*} A₅B_{7,5}; MS^{*} A₁B₃ (MSb^{*} + AIA, 1 mg/l + 3 mg/l de BAP). Aucun de ces nouveaux milieux n'a permis l'apparition de nouvelles pousses : les cals reprennent leur aspect original sur le milieu MSb^{*}, ceux en culture sur les deux autres milieux ne manifestent pas de changement particulier. Actuellement, d'autres milieux sont testés qui ne contiennent que de la BAP en grande quantité (10 et 20 mg/l) et du sulfate d'adénine (160 mg/l).

2-3 : Conclusions et discussion.

2-3-1 : Initiation des cals à partir des tissus floraux et inflorescentiels simple (tests préliminaires)

Nous avons pu constater, en premier lieu, que le 2,4 D était le seul régulateur de croissance parmi ceux que nous avons utilisés pour ces expériences, à promouvoir la callogenèse de la quasi totalité des explants. Avec ce même milieu nous avons pu constater, en outre, que la capacité de réaction des explants est directement liée à leur stade de développement : les ovaires qu'ils soient prélevés sur des inflorescences au stade

femelle ou mâle ont toujours donné des cals mais ceux qui sont très jeunes (de fleurs mâles) présentent des proliférations de l'ensemble des tissus, alors que avec ceux qui sont plus âgés (de fleurs femelles), seules les parties internes donnent un cal. Une des causes de l'inhibition des tissus externes, pourrait être l'éthylène qui, comme l'a montré BRASIL (1982) est présent en grande quantité dans les ovaires âgés de bananier.

L'importance du stade de développement a pu être, également bien mis en évidence au niveau des anthères et aussi des bractées. Sur ces dernières, il est remarquable que, sur des milieux contenant du 2,4 D, à l'inverse de ce que nous avons vu avec les fragments de feuilles, ce soit la totalité des tissus de l'organe qui participe à la formation du cal. A notre sens, cette différence de comportement de ces deux types d'explants, nous confirme que les bractées, sans être des pièces florales, ont perdu cependant, certaines caractéristiques foliaires.

A l'inverse du 2,4 D, l'ANA, associé ou non à de la BAP, ne peut stimuler une callogenèse qu'à partir des tissus internes des tranches d'ovaires. Nous pensons, comme nous l'avons déjà mentionné pour les fragments de feuilles, que l'inactivation des tissus est liée au noircissement des explants (en présence d'ANA et plus encore de BAP), phénomène qui est empêché par l'adjonction de 2,4 D au milieu qui inhiberait la formation et/ou l'oxydation des phénols. Les tissus ovariens, qui peuvent proliférer sans 2,4 D dans le milieu représentent, par conséquent, une exception.

Nous ne savons pas, sur les ovaires de fleurs femelles d'où provient le développement des "boules" observées en présence d'ANA. Mais compte tenu de leur point d'initiation (tissus de l'endocarpe) et du fait que chacune d'elles est bien individualisée, et se développe indépendamment de celles qui l'entourent, nous sommes tentés de croire qu'elles proviennent d'une hypertrophie

des tissus de l'ovule. De plus nous n'avons jamais observé ce type de développement sur les fragments d'ovaire de fleurs mâles, qui ne contiennent pas d'ovules.

Compte tenu de tous ces résultats, les fragments d'ovaire, et plus particulièrement de fleurs mâles, paraissent être le meilleur matériel pour produire des cals, mais ceux-ci qu'ils soient issus de l'ectocarpe ou du méso-et endocarpe restent très friables et ne présentent aucune organogenèse particulière au cours des repiquages. Quels que soient les changements de composition de milieu tendant à favoriser la caulogenèse que l'on ait appliqués, aucune modification de l'organisation de ces cals n'est apparue, et c'est pourquoi nous avons choisi de ne pas continuer nos recherches dans cette direction.

Ces travaux réalisés avec ce matériel chez le bananier ne sont pas originaux. En effet SRINIVASA et coll.(1982) ont déjà obtenu des cals à partir de fragments d'axes inflorescentiels, en présence de 2,4,5 T (2 mg/l) dans le milieu. Ces auteurs notent que les cals portent des structures qu'ils ont appelées "pro-embryoïdes" et des racines qui, occasionnellement, se développent mais aucune pousse feuillée n'est apparue. Les résultats de ces chercheurs confirment en l'occurrence avec un matériel floral, ce que nous avons constaté sur les fragments de feuilles, à savoir que chez le bananier le 2,4,5 T est plus efficace que le 2,4 D pour l'initiation de la callogenèse.

Enfin avec des tissus ovariens, des travaux déjà anciens (MOHAN RAM et coll.,1964) et d'autres plus récents (BRASIL,1982) ont montré qu'il était possible d'initier des cals en présence de 2,4 D. Ces auteurs ont remarquer par ailleurs que les proliférations ne pouvaient avoir lieu que si les ovaires étaient prélevés avant la crise climactérique mais jamais après.

2-3-2 : Callogenèse à partir d'explants inflorescentiels plus complexes.

2-3-2₁ : Conditions et lieux d'apparition des cals.

L'apparition et l'entretien sur le milieu MSb* dépourvu de régulateurs de croissance a été possible, à notre sens parce que le milieu MS est, dans son ensemble, très riche et très complet, et que l'adjonction à ce milieu d'hydrolysate de caséine (500mg/l) outre son apport spécifique en acides aminés, augmente considérablement la quantité d'azote réduit (ions NH_4^+) qui, comme il a été déjà vu par ailleurs, favorisent la callogenèse. Néanmoins, nous avons quand même constaté que l'apparition des cals, que par ailleurs nous ne maîtrisons pas pour l'instant, étaient plus fréquentes sur des milieux contenant les auxines et cytokinines et qu'ils croissent sur ces milieux. Le fait que nous n'ayons pas obtenus de cals sur les axes inflorescentiels de plantain (cv. "Ekona"), sur lesquels néanmoins des plantes sont apparues, nous semble plus lié à un concours malheureux de circonstances qui fait que les conditions de callogenèse ne se soient pas présentées plutôt qu'à une inhibition du matériel végétal, due au génotype lui-même.

Nous n'avons pas pu situer avec précision le point d'initiation de tous ces cals, toutefois nous avons remarqué qu'ils apparaissaient surtout à la base des boutons floraux, ou des fleurs modifiées, et de façon plus générale, à proximité de tous les tissus qui ont été activés. Il serait intéressant de voir, en utilisant ces mêmes milieux, s'il est possible de produire ce type de cals avec des explants floraux du type de ceux que nous avons utilisé au cours des tests préliminaires, en ne prenant par exemple non pas comme nous l'avons fait, des ovaires de fleurs mâles coupés en tranches, mais entiers, et

en les plaçant dans des conditions telles que le noircissement des tissus lié à la production et l'oxydation des phénols soit limité (culture en milieux liquides; adjonction de réducteurs ou charbon actif sur les milieux solides).

2-3-2-2 : Analyse de la structure et de l'organogenèse des cals.

A l'inverse des proliférations anarchiques que nous avons obtenu avec les fragments d'ovaires, les cals, issus des explants inflorescentiels paraissent constitués, du moins sur le milieu MSb* et pour une partie, sur le milieu MS*A₂B₂, d'un ensemble de petites unités structurales individualisées, que nous avons appelé "nodosités". Au cours de nos travaux sur ce matériel, nous nous sommes rendu compte que l'étude de l'organogenèse de ces cals passait, en fait, par celle des "nodosités" qui selon les milieux et l'âge de la culture prennent un aspect différent.

Celles-ci, provenant à l'origine d'une seule cellule suivent, par exemple sur le milieu MS*A₂B₂, un développement complexe et, du moins pour les premières étapes, parfaitement défini. En effet nous avons pu constater qu'à l'issue des premières divisions, un épiderme se différencie, individualisant ainsi les "nodosités" les unes des autres.

Compte tenu de toutes les observations que nous avons pu faire sur ce matériel, nous en sommes venus à penser que nous nous situons bien ici, à l'inverse de ce que nous avons obtenu avec les cals d'origine foliaire, dans le cadre d'un développement embryogénétique. Dans cette hypothèse, les premiers stade de développement des embryons somatiques représentés chacun par une "nodosité", seraient normaux. Mais, par la suite de conditions de culture non adéquates, ceux-ci ne pourraient continuer à se différencier. Les "nodosités", au lieu de continuer leur développement en plantule, continuerait

à croître sous leurs formes primitives (épiderme + tissus internes) sans présenter d'organisation particulière. Les circonvolutions que nous avons observées en coupe histologique sur les cals cultivés sur le milieu $MS A_2 B_2^*$ représenteraient, ou bien les stades ultimes de la croissance d'une "nodosité", ou bien le résultat de la fusion de plusieurs "nodosités" plus petites entre elles

L'interprétation que nous donnons de l'évolution de la morphologie des cals, semble confirmée, à notre avis, par le fait que les feuilles se développent de façon très organisées sur les petites "nodosités" (portées par des cals initiés depuis peu de temps), alors qu'elles apparaissent beaucoup plus difficilement et de façon anarchique sur ceux qui sont plus gros, en culture depuis beaucoup plus longtemps. A ce propos, il est à noter, dans ce dernier cas, que l'ontogenèse des feuilles à partir des tissus superficiels, n'est pas sans rappeler celle qu'on observe sur les protocormes d'orchidées (CHAMPAGNAT et coll., 1966), mais à l'inverse de ceux-ci, les feuilles sur notre matériel, restent bloquées dans leur développement et ne portent jamais à leur aisselle, de méristèmes caulinaires.

L'apparition de plantes ^{portées} par des cals en culture depuis plus d'un an, nous paraît à l'inverse de la précédente, être liée à un processus de néoformation caulinare. En effet, nous avons pu remarquer que d'une part, la forme et la couleur des feuilles portées par ces pousses végétatives sont totalement différentes de celles qui se sont développées directement sur les nodosités et d'autre part, les coupes histologiques montrent que le méristème caulinare est en parfaite continuité vasculaire avec les tissus internes du cal et non en discontinuité comme le laisserait supposer un développement embryogénétique.

Enfin, il faut remarquer que, ces cals obtenus à partir d'explants inflorescentiels complexes sont, chez le bananier, un matériel intéressant puisqu'ils permettent de s'affranchir des problèmes de noircissement et de

nécrose, dûs , en partie, à la présence de fortes concentrations de cytokinines dans les milieux. En conséquence, ils ouvrent des voies de travail, interdites, jusqu'alors, avec les autres types de proliférations (cals d'origine foliaire, par exemple).

Finalement, quelles que soit les modalités exactes d'organogenèse mis en jeu, c'est la première fois à notre connaissance, que des plantes sont obtenues à partir de culture de tissus de bananiers. Compte tenu de l'âge du cal, il est vraisemblable que, par cette méthode, les plantes présentent des variations par rapport à celle de départ et que, par conséquent cette méthode puisse être utilisée ultérieurement pour atteindre le but que nous nous sommes fixés au départ, c'est à dire, accroître la variabilité des bananiers.

3) Isolement et mise en culture de cellules isolées et de protoplastes.

3-1 : Essais effectués à partir de divers matériels végétaux.

Tous les essais d'isolement de protoplastes à partir de limbes de bananiers d'origine diverses (triploïdes AAA, AAB et diploïdes AA et BB) n'ont jamais donné de protoplastes isolés mais seulement une suspension de cellules, de formes variées, à cytoplasme rétracté sous l'effet de la forte pression osmotique exercée par le mannitol. Ce résultat est obtenu quels que soit l'espèce ou le cultivar employé, le conditionnement des plantes avant le prélèvement des feuilles (lumière ou obscurité) (Pl. XVI.1).

Un résultat semblable est trouvé si l'on utilise des cals d'origine foliaire obtenus avec le 2,4 D (de cv. "Américani"), qu'ils aient été ou non placés à la lumière avant le prélèvement (Pl. XVI.2).

Par contre, si l'on fait un isolement à partir de cals à "nodosités" d'origine inflorescentielle, cultivés sur le milieu $MS^* A_2B_2$, on ne récupère, après rinçage, que des protoplastes parfaitement sphériques, dépourvus de coque cellulosique. Ceux-ci, de diamètre très variable, présentent tous un cytoplasme très dense (Pl. XVI. 3 a et b).

Ces résultats conduisent aux conclusions suivantes :

- Les enzymes pectinasiques (macérozyme, pectolyase) agissent dans non conditions d'expériences avec tout le matériel végétal employé, cela quelle que soit son origine. Leur efficacité est par ailleurs confirmée puisque l'on peut obtenir des suspensions cellulaires avec tous ces tissus si on les applique seules (sans cellulases, ni hémicellulases) dans les mêmes conditions.
- Par contre, selon la nature du matériel utilisé, la digestion des parois cellulosiques par les cellulases et hémicellulases est possible ou non; ces substances sont totalement inefficaces sur les parois de nature foliaire (cellules de limbe et de cal) et à l'inverse, parfaitement efficaces avec les cellules de cals à nodosités, d'origine inflorescentielle.

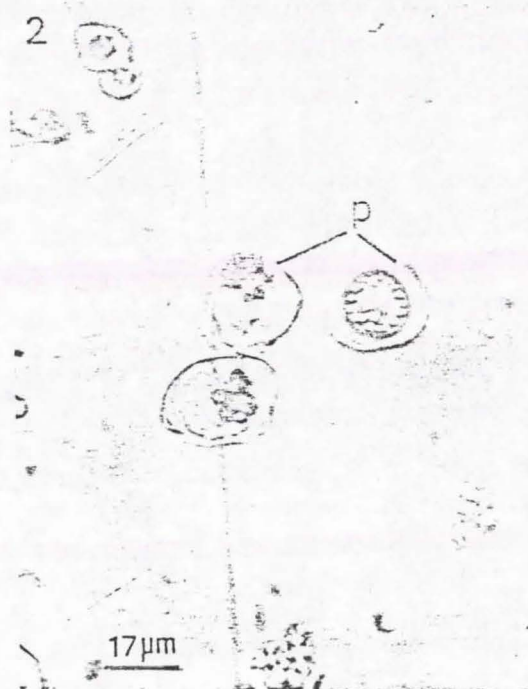
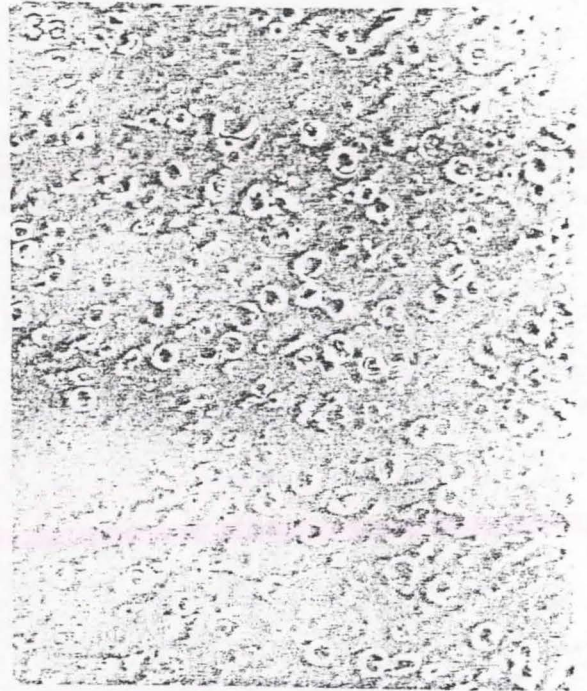
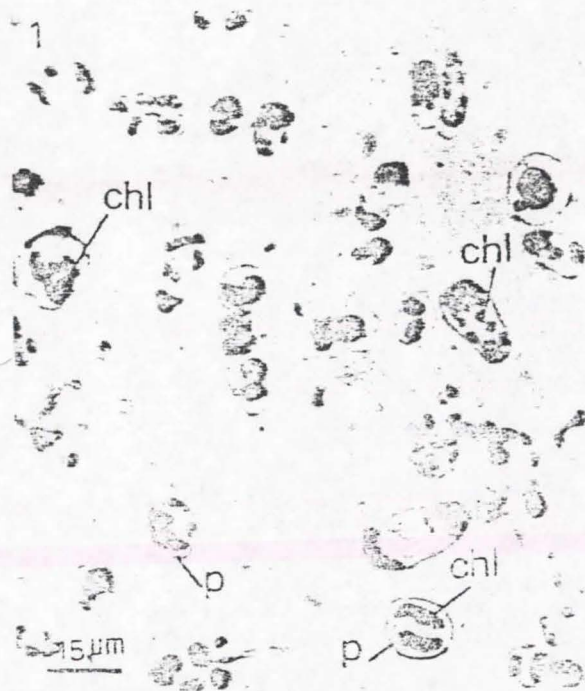


Planche XVI: Isolement de cellules et protoplastes.

1 : Cellules isolées à partir de limbe; 2: Cellules isolées à partir de cals d'origine foliaire cultivés sur milieu $MS_b + 2,4D$; 3 a et b: Protoplastes isolés à partir de cals à nodosités d'origine inflorescentielle cultivés sur milieu MS^*_{A2B2} .
chl.:chloroplaste; p.:paroi cellulosique.

- Il s'agit d'une réponse qualitative à l'action des enzymes cellulases. En effet, pour une quantité donnée de pectinases, quelles que soient les concentrations en cellulases et hémicellulases testées (supérieures à celles indiquées), on obtient le même résultat négatif pour les cellules de limbes et de cals d'origine foliaire.

D'autres enzymes, à activité cellulasique (cellulysin, drisérase), utilisés dans un large éventail de concentrations (0,1 à 5 p. 100 poids/volume), aboutissent au même résultat.

- Par ailleurs, il semble que ce soit la nature du matériel végétal et moins son préconditionnement (lumière ou obscurité) qui ait une importance pour que l'action des cellulases et hémicellulases soit efficace. Dans cet esprit, et pour vérifier que les tissus inflorescentiels étaient bien en cause, nous avons tenté d'isoler des protoplastes à partir de bractées et tépales de fleurs de cv. "Grande Naine". Malheureusement, cette opération a été empêchée par la présence d'une sève abondante et de son durcissement très rapide à l'air qui ont entraîné une nécrose complète du matériel.

- Enfin, la réponse ne paraît pas être la caractéristique d'un clone particulier ; tous les tests d'isolement de protoplastes réalisés à partir de cellules de limbes ont donné le même résultat négatif, qu'il s'agisse d'espèces diploïdes ou de cultivars triploïdes.

3-2 : Conclusions.

nous avons mis en évidence des qualités différentes de notre matériel végétal chez le bananier (Musa s.p.) en ce qui concerne la possibilité de digestion des parois cellulosesiques par les cellulases et hémicellulases. Nous ne savons pas si ces différences de réponses sont dues à des modifications de la paroi elle-même ou plutôt à une inhibition de l'enzyme par un composé élaboré par les cellules lorsque celles-ci se trouvent dans un état de différenciation donné.

Il est à noter, à ce niveau, que les limbes, ainsi que les cals d'origine foliaire, noircissent rapidement et meurent lorsqu'il sont sur un milieu contenant de la BAP (à 1 mg/l environ) alors que les cals d'origine inflorescentielle sur le même milieu, croissent normalement, sans montrer de signes de nécrose.

Les résultats que nous avons obtenus sont l'aboutissement de travaux entrepris pour trouver une méthode d'isolement de protoplastes, fiable. Malgré les obstacles rencontrés (difficulté de dégradation des parois cellulodiques) il est enfin possible d'isoler pour la première fois, en quantité suffisante et de façon répétitive, des protoplastes de bananier.

Ces protoplastes, dont le cytoplasme est très dense, pourraient présenter de bonnes aptitudes à se diviser ultérieurement. En outre, ils sont d'autant plus intéressants qu'ils sont issus des cals noduleux d'origine inflorescentielle et que ces derniers, ainsi que nous l'avons vu, se développent selon des modalités tout à fait particulières proches, à notre avis, de celles de l'embryogenèse somatique, et qui, dans tous les cas, montrent des différenciations caulinaires.

Enfin, ces travaux qui mettent l'accent sur la qualité du tissu à utiliser chez le bananier, montrent une nouvelle fois l'importance du choix du matériel végétal pour réussir un isolement de protoplastes. Pour arriver à un tel résultat, d'autres chercheurs, sur des espèces ligneuses, ont fait apparaître aussi l'importance du mode de culture (in vitro ou in vivo) et du stade de développement des plantes (SMITH et Mc COWN, 1982-1983).

D - Conclusions générales.

1) L'objectif du travail.

Tout au long de notre travail, nous avons cherché à montrer, au fil de nos résultats, l'intérêt que peut présenter l'emploi de diverses techniques de cultures in vitro pour l'amélioration du Bananier (Musa sp.) ceci, dans le cadre de la multiplication conforme et non conforme.

Chez cette plante, en effet, où les possibilités de créer de nouvelles variétés par les voies classiques d'hybridation sont, comme nous l'avons déjà signalé, très restreintes, les techniques de culture in vitro sont susceptibles d'être un outil qui permet de passer outre les barrières de stérilité existantes (fécondation in vitro, voie de l'haplogénèse, par exemple) mais aussi, d'élargir la variabilité existante et, ensuite, de l'insérer dans les programmes de sélection.

Il ne faut pas oublier, non plus, que la multiplication végétative du Bananier est assez lente, par les méthodes traditionnelles et qu'il est important, aussi dans ce cas, de trouver une technique de culture in vitro, qui permette de propager rapidement, une structure génétique intéressante mais en étant absolument certain qu'elle puisse fournir des plantes conformes au matériel de départ. En poursuivant ces deux objectifs notre souci a été, à chaque fois que cela a été possible, de relier les observations morphologiques à une étude cytologique et, si possible, de préciser dans quel cadre nous nous situons.

2) Les données acquises.

Nous avons essayé de déterminer, dans le cadre de la multiplication végétative in vitro, et en utilisant un protocole expérimental similaire à celui déjà utilisé par d'autres chercheurs, les modalités d'organogenèse des nouvelles plantes sur des rejets prélevés au champ, mais aussi, sur des cormes de bananiers déjà cultivés in vitro.

Nous avons vu que, dans certains cas, les plantes étaient issues d'une réorganisation plus ou moins profonde selon l'importance des portions méristématiques restantes et que, dans ces cas, on se situait vraisemblablement dans le cadre de la multiplication conforme. En outre, nous avons remarqué sur notre matériel que les méristèmes végétatifs, une fois mis en place, se divisent plusieurs fois, ce qui, dans ce type d'expérience, reste une situation tout à fait originale.

Dans d'autres cas, les plantes proviennent de néoformations directes sur la tige, et les risques d'entraîner des variations par rapport au type de départ ne sont pas, alors, totalement à éliminer bien qu'aucune prolifération ne soit visible.

Ces résultats, à notre avis, revêtent une certaine importance et devront être sérieusement pris en considération, surtout si on envisage, dans un avenir proche, d'utiliser le clonage accéléré des bananiers en culture in vitro pour produire des plantes saines et homogènes.

Les travaux effectués à partir des apex inflorescentiels ont montré qu'il était possible aussi sur de tels explants, de provoquer le développement de pousses végétatives et que leur organogenèse dépend, en grande partie, des tissus à partir desquels, elles sont initiées (tissus à développement fini ou infini). Etant donné l'état d'avancement de nos travaux dans ce domaine, nous ne savons pas si ces résultats ont un quelconque intérêt pour le problème qui

nous préoccupe (les plantes pourraient peut être fleurir plus précocément). Dans l'hypothèse où les plantes seraient identiques à la plante de départ, porteuse de l'inflorescence, cette méthode présenterait un intérêt relatif en raison du faible taux de multiplication comparé à celui que l'on obtient avec les rejets. Dans le cas inverse, il faudrait analyser le type de variation engendrée et ce, en fonction de l'origine des plantes sur l'axe inflorescentiel.

Les capacités d'initiation des cals, à partir d'explants d'origines très diverses et l'analyse de leur potentialités d'organogenèse, constituent à l'inverse des recherches de multiplication accélérée précédemment cités, le but essentiel de notre travail qui consistait, avant tout à essayer, par les méthodes de culture in vitro, à élargir la variabilité chez le Bananier. Dans ce domaine, en utilisant toutes sortes de matériel, nous avons effectué une revue assez exhaustive du comportement des différents types d'explants prélevés dans les parties végétatives et florales de la plante. Nous avons noté en particulier que, bien qu'ils puissent, pratiquement tous donner des cals, de formes très diverses selon les milieux et l'origine des tissus, les proliférations sont fortement limitées par un noircissement intense des milieux et des tissus eux-mêmes, entraînant la mort de ces derniers.

Nous avons vu, en premier lieu que les cals d'origine foliaire, ne pouvaient donner (pour l'instant, et dans nos conditions de culture) qu'une organogenèse de type racinaire alors que ceux, issues des explants inflorescentiels complexes, repiqués un grand nombre de fois, manifestaient une organogenèse conduisant à des pousses végétatives. Ces dernières se sont développées vraisemblablement selon deux modalités bien différentes, l'une par la voie de l'embryogenèse somatique, l'autre par néoformation caulinaire sur cal. Quoiqu'il en soit, nous savons actuellement, quels sont la morphologie, le lieu et les conditions d'initiation des cals qui ont manifesté des organogenèses réellement intéressantes (à savoir des différenciations de type caulinaire).

En outre, ces cals, issus d'explants inflorescentiels sont d'autant plus intéressant que ce sont les seuls qui nous aient permis d'obtenir des protoplastes, alors qu'à partir de limbes ou de cals issus de feuilles, on n'obtient, en utilisant des enzymes courantes du commerce, que des suspensions de cellules isolées, la paroi cellulosique ne se dégradant pas.

3) Les limites.

Compte tenu du temps qui nous était imparti, il ne nous a pas été possible d'approfondir les voies de recherche les plus prometteuses que nous avions ouvertes c'est à dire, l'étude détaillée du développement des cals à "nodosités" capable d'engendrer une organogenèse et aussi, la culture des protoplastes, une fois ^{leur} isolement réussi. Malgré tout, nous possédons actuellement des indications sur les conditions d'apparition du type de cal à rechercher, mais ces données restent très fragmentaires.

L'initiation des proliférations dépend, en effet, beaucoup de l'état du matériel mis en culture de son génotype et de nombreux autres facteurs incontrôlés. De même, toutes les plantes que nous avons obtenues, sont toutes apparues sur des cals entretenus sur un même milieu. Nous sommes par conséquent encore loin de maîtriser d'une part la phase de prolifération active et d'autre part, la phase de différenciation qu'elle conduise à la caulogenèse ou à l'embryogenèse. Enfin, si notre travail repose sur des observations morphologiques et anatomiques assez précises, il souffre, en revanche, d'un manque de données biométriques. Celles-ci, faites pour chaque expérimentation, sur un grand nombre d'individus, auraient permis une analyse statistique, qui nous aurait amené à dégager de nos expériences, non plus des tendances, mais réellement des résultats probants et chiffrables.

4) Les perspectives.

Néanmoins, compte tenu de toutes les données désormais acquises au cours de ce travail, il nous paraît maintenant essentiel d'orienter les travaux de culture *in vitro* chez le Bananier, pour la partie qui nous concerne, toujours dans les deux grandes directions déjà définies, mais en sachant avec beaucoup plus de précision, ce qu'il faut rechercher.

En ce qui concerne la multiplication accélérée des bananiers *in vitro*, à partir de méristèmes végétatifs et floraux, il faut voir à présent au champ, si les plantes issues d'un même parent sont bien identiques entre elles et au génotype de départ, tant au niveau de critères qualitatifs que de caractères quantitatifs.

Par ailleurs, ces tests nous permettront de voir si les plantes ne sont pas trop affectées par un passage en culture *in vitro*: ainsi, par exemple, si la floraison a lieu, ou bien si elle est retardée par rapport à celle que l'on peut avoir avec un rejet, ou bien, à l'inverse, avancée pour les plantes issues de reversions florales.

Pour la production de cals et pour tous les travaux qui visent à accroître la variabilité on sait, à présent, qu'il faut s'intéresser avant tout aux tissus inflorescentiels et floraux.

Avec ce matériel, il sera nécessaire de répéter les expériences afin de déterminer précisément, les paramètres qui influent sur l'initiation de la callogénèse et de promouvoir systématiquement le développement de pousses feuillées. Cette étude devra bien entendu, être poursuivie sur le matériel déjà utilisé, mais aussi, entreprise sur le matériel qu'on se propose d'améliorer c'est à dire pour l'instant, les bananiers "plantains". Enfin, compte tenu du fait que le problème de l'isolement des protoplastes est, ainsi que celui des cellules isolées, ^{résolu}, il est nécessaire de pousser plus loin les investigations dans ce domaine afin de voir, s'il n'est pas possible d'appliquer

des pressions de sélections précoces, qui nous permettent d'isoler certains génotypes intéressants (pour la résistance au cercospora par exemple, par adjonction de cercosporine au milieu).

BIBLIOGRAPHIE

- AHEE (J.), ARTHUIS (P.), CAS (G.), DUVAL (Y.), GUENIN (G.), HANO-
VER (J.), HANOVER (P.), LIEVOUX (D.), LIORET (C), MALAURIE (B.),
PANNETIER (C.), RAILLOT (D.), VARECHON (D.), ZUCKERMAN (L.). 1981.
La multiplication végétative in vitro du palmier à huile par
embryogénèse somatique
Oléagineux, 36, 113-118.
- BARKER (W.G.). 1959. A system of maximum multiplication of the bana-
na plant. Tropical Agriculture, 36, 275-284.
- BARKER (W.G.) and STEWARD (F.C.). 1962. Growth and development of the
banana plant.
 - I: The growing region of the vegetative shoot. Ann. Bot.
London, 26, 389-412.
 - II: Transition from the vegetative to the floral shoot in
Musa acuminata cv. Gros Michel. Ann. Bot. London, 26, 413-423.
- BERG (L.A.) and BUSTAMANTE (M.). 1974. Heat treatment and meristem
culture for the production of virus free bananas. Phytopathologie,
64, 320-322.
- BERGEY'S. 1974 . Manual of determinative bacteriology. 8ème éd.
Edts Williams and Wilkins Company, Baltimore. USA.
- BONNEL (E.), DEMARLY (Y.), ESSAD (S.). 1983. Evolution anatomique des
tissus foliaires de canne à sucre (Saccharum sp.) cultivés in vitro.
Canadian Journal of Botany, 61, 830-836.
- BRASIL (O.G.). 1982. Tissue culture from banana fruit (Musa acumi-
nata AAA). Growth and some respiratory enzyme property from banana
fruit callus. In: Proc. 5 th. Cong. Plant, Tissue and Cell Culture,
Tokyo, p.79.
- CHAMPAGNAT (M.), MOREL (G.), CHABUT (P.) et COGNET (A.M.). 1966.
Recherches morphologiques et histologiques sur la multiplication
végétative de quelques orchidées du genre CYMBIDIUM. Rev. Gen.
Bota., 73, 706-746.
- CHAMPION (J.). 1963. Le bananier. Edts Maisonneuve (G.P.) et Larose,
Paris.
- CHAMPION (J.). 1967. Les bananiers et leur culture. Tome I: Botani-
que et génétique. Edt. Institut Français de Recherches Fruitières
Outre-Mer, Paris.
- CHU CHIN-CHING, WANG CHING-CHU and SUN CHING-SAN, 1975. Establishment
of an efficient medium for anther culture of rice through compa-
rative experiments on the nitrogen sources. Scientia Sinica, XVIII,
(5), 659-668.

- CONGER (B.V.), and Mc DONNEL(R.E.). 1983. Plantlet formation from cultured inflorescences of Dactylis glomerata L. .Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, 2, 191-197.
- COX (E.A.), STOTZKY (G.) and GOOS (R.D.).1960.In vitro culture of Musa balbisiana Colla embryos. Nature, 185 (4710), 403-404.
- CRONAUER (S.) and KRIKORIAN (A.D.)
 .1983. Somatic embryos from cultured tissues of triploid plantains (Musa ABB).Plant Cell Reports, 2, 289-291.
 .1984. Multiplication of Musa from excised stem tips. Annals of Botany, 53, 321-328.
- CURE (W.W.) and MOTT (R.L.).1978). A comparative anatomical study of organogenesis in cultured tissues of maize, wheat and oat.Phy-siol. Plant., 42, 91-96.
- DAVEY (M.R.).1983.Recents developments in the culture and the regeneration of plants protoplasts.In: Protoplasts 1983. 6th. International Protoplasts Symposium, BASEL, 19-29.
- DE LANGHE (E.), SWENNEN (R.), et WILSON (G.).1983.Aspects hormo-naux du rejetonnage des bananiers plantains.Fruits, 38 (4), 318-325.
- DORE (R.), SWAMY (N.K.), SRNIVASA (R.) and CHACKO (E.K.).1982/83. Scientia Horticulturae, 18, 247-252.
- DUNSTEAN (D.I.) and SHORT (K.C.).1979.Shoot production from the flower head of Allium cepa L.(Onion).Scientia Horticulturae, 10, 345-356.
- FREARSON (E.M.), POWER (J.B.) and COCKING (E.C.).1973.Dev. Biol.,33, 130
- GAUTHERET, 1959. La culture des tissus végétaux. Masson éd.,Paris.
- GUZMAN (E.V.) and DECENA (A.C.).1978.IN: Fourth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (IAPTC), Calgary, Canada.
- HARMS (C.T.) and POTRYKUS (J.).1978.Fractionation of plant protoplasts by iso-osmotic density gradient centrifugation. Theor. Appl. Genet., 53, 57-63.
- HUNAUULT (G.).1979.Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tisuus de monocotylédones cultivées in vitro. IV Etudes de quelquesespèces appartenant à des famillesautres que les Agavacées et les Liliacées.Rev. Cytol. Biol. Veget. Bot,2, 231-258.
- KASPERBAUER (M.J.), BUCKNER (R.C.), SPRINGER (W.D.). 1980.Haploid plants by anther panicle culture of tall fescue. Crop Sci., 20, 103-107.
- KING (P.J.), POTRYKUS (I.), THOMAS (E.).1978. In vitrogenetics of cereals: problems and perspectives. Physiologie Végétale,16, 381-399.

- LARKIN (P.J.) and SCOWCROFT (W.R.).1981.Somaclonal variation. A novel source of variability from cell cultures for plant improvment. Theor. Appl. Genet., 60,197-214.
- LOISEAU (J.E.).1954.Sur des fasciations provoquées.C.R. Acad. Sc., Paris,238, 1259-1262.
- MA (S.S.), SHII (C.T.) and WANG (S.O.).1978.Regeneration of banana plants from shoot meristem tips and inflorescence section in vitro. In: XXth. International Congress of Horticulture of Sydney.Communication n° 1369.
- MANTE (S.) and TEPPER (H.B.).1983.Propagation of Musa textilis Née plants from apical meristem slices in vitro.Plant Cell Tissue and Organ Culture,2,151-159.
- MARTIN (C.),DULIEU (H.) et CARRE (M.).1967. Sur la possibilité de rendre des plantes virosées indemnes de virus par la culture de méristèmes inflorescentiels et floraux.C.R. Acad. Sc. Paris, t. 264, 1994-1996.
- MEINS (F.).1983.Heritable variation in plant cell culture. Ann. Rev. Plant. Physiol., 34, 327-346.
- MENENDEZ (T.) and SHEPHERD (K.). 1975.Breeding new bananas. May/June, 104-111.
- MOHAN RAM (H.Y.) and STEWARD (F.C.).1964.The induction of growth in explant tissue of the banana fruit. Can. J. Bot.,42, 1559-1579.
- MOREL (G.).1964.La culture in vitro du méristème apical. Rev. Cytol. Biol. Vég.,27, 307-314.
- MURASHIGE (T.) and SKOOG (F.).1962.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant.,15, 473-497.
- NOZERAN (R.) et BANCILHON-ROSSIGNOL (L.).1977.La multiplication végétative des végétaux vasculaires. Soc. Bot. Fr. Coll. Mult. Végé., 124,59.
- NOZERAN (R.), DUCREUX (G.) et ROSSIGNOL-BANCILHON (L.).1982.Réflexions sur les problèmes de rajeunissement des végétaux. Bull. Soc. Bot. Fr., 2, 107-130.
- ORTON (T.J.).1983. Experimental approches to the study of somaclonal variation. Plant Molecular Biology Reporter, 1-2, 67-76.
- POLLOCK (K.), BARFIELD (D.G.) and SHIELDS (R.).1983.The toxicity of antibiotics to plant cell cultures.Plants cells Reports, 2 (1), 36-39.

- SCOWCROFT (W.R.) and LARKIN (P.J.).1982.Somaclonal variation: a new option for plant improvment. In: Plant improvment and somatic cell genetics. Eds. Vasil (K.), Scowcroft (W.R.),and Frey (k.J.). Academic Press.
- SHEPARD (J.F), BIBNEY (D.), BARSBY (T.) and KEMBLE (R.).1983.Genetic transfer in plant through interspecific protoplast fusion. Science, 219, 638-688.
- SIMMONDS (N.W.). 1962. The evolution of the bananas. Longmans, Green and Co Ltd. London.
- SKUTCH (A.F.)
 - .1927. Anatomy of the leaf of banana Musa sapientum L. var.Hort. Gros Michel. The Botanical Gazette, 84, 337-391.
 - .1930. On the development and morphology of the leaf of the banana (Musa sapientum L.). American Journal of Botany,17, 252-271.
- SMITH (M.A.L.) and Mc COWN (B.H.).1982-83. A comparison of source tissue for protoplast isolation from the woody plant species. Plant Science Letters,281, 149-156.
- SRINIVASA RAO (N.K.), CHACKO (E.K.), DORE SWAMY (R.) and NARAYANA SWAMY (S.).1982.Induction of growth in explanted inflorescence axis of banana.Current Sciences, 51 (13),666-667.
- SWAMY DORE (R.), SRINIVASA (R.) and CHACKO (E.K.).1982/83.Tissue culture propagation of banana. Scientia Horticulturae,18,247-252.
- TRAN THANH VAN (M.).1973.b:Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of Nicotiana tabaccum L.Planta, 246, 44.
- VASIL (V.) and VASIL (I.K.).1980.Isolation and culture of cereals protoplasts. Theor. Appl. Genet.,56, 97-99.
- VESSEY (J.C.), RIVERA (J.A.).1981. Meristem culture of bananas. Turrialba, 31 (2), 162-163.
- WERNICKE (W.) and BRETELL (R.).1982.Morphogenesis from cultured leaf tissue of Sorghum bicolor. Protoplasma, 111 (1),19-27.
- WERNICKE (W.), BRETELL (R.), WARIZUKA (T.) and POTRYKUS (I.).1981. Adventitious embryoid and root formation from rice leaves. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 103, 361-365.
- ZAPROMETOV (M.N.).1978. Enzymology and regulation of the synthesis of polyphenol in cultured cells.In: "Frontiers of plant tissue culture".Thorpe (T.H.) ed., IAPTC at University Calgary,Calgary, pp335-343.

Annexe I : Liste des cultivars et espèces sauvages
citées

Cultivars diploïdes :

- Sucrier (AA); Pisang lilin (AA); Sikuzani (AA); Paka (AA); Tongat (AA).

Cultivars triploïdes :

- AAA: série Gros Michel, Hight Gate.
série Cavendish (bananes douces) : Américani, Grande Naine, Poyo, 901.
- AAB: série Plantain (banane à cuire): French Plantain, Horn Plantain, Batard, Ekona, Saba.
autres: Mysore (banane à cuire).
- AAB: Bluggoe, Silver Bluggoe, Prata, Pélipita.

Espèces : sauvages diploïdes:

- Musa acuminata Colla (AA) s.sp. malaccensis Simmonds
s.sp. banksii Simmonds
s.sp. microcarpa Simmonds
s.sp. burmannica Simmonds
s.sp. burmannicoides Simmonds
s.sp. siamea Simmonds
clônes: Long Tavoy, Calcuta 4
- Musa balbisiana Colla (BB).

Annexe II: Composition du milieu MS_b

- Macroéléments de MS
 - Microéléments de MS voir annexe III
 - Vitamines de Morel :
 - panthoténate de calcium 1,00 mg/l
 - méso-inositol 100,00
 - acide nicotinique 1,00
 - pyridoxine HCl 1,00
 - thiamine 1,00
 - biotine 0,01
 - Fe EDTA :
 - Na₂EDTA 37,30 mg/l
 - FeSO₄,7H₂O 27,80
 - Saccharose 20,00 g/l
 - Agar 7,00 g/l
- pH : 5,6 - 5,8 (avec KOH ou HCl)

Annexe V : Préparation des colorants

- Bleu alcian : mettre 1 gr de bleu alcian dans 3 cc d'acide acétique, puis compléter avec de l'eau distillée à 100 cc.
- Safranine : mettre 1 gr de safranine dans 100 cc d'alcool à 70°.
- Carmin chlorhydrique : mélanger 15 ml d'eau distillée, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et 4 gr de carmin 40. Faire bouillir le mélange 10 mn. Laisser refroidir , puis ajouter 95 ml d'alcool éthylique à 85°. Filtrer.
- Carmin acétique : mélanger 55 ml d'eau distillée, 45 ml d'acide acétique et 0,5 gr de carmin 40. Faire bouillir 1 heure puis filtrer.

Annexe III : Composition saline des différents milieux.

	Sels de <u>MS</u> (Murashige et Skoog, 1962)	Sels de <u>N6</u> (Chu Chin-Ching et coll., 1975)	Sels de <u>KNOP</u> (Gautheret, 1959)
<u>- Macroéléments</u> (en gr/l)			
NH_4NO_3	1,650	—	—
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	0,463	—
KNO_3	1,900	2,830	0,625
KH_2PO_4	0,170	0,400	0,125
$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0,440	0,166	—
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,370	0,185	0,125
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	—	—	0,500
<u>- Microéléments</u> (en mgr/l)			
H_3BO_3	6,200	1,600	0,025
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	22,300	4,400 ($\text{MnSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$)	1,000
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	8,600	1,300	0,050
KI	0,830	0,800	0,250
$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0,250	—	—
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	—	0,025
$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	—	0,025
$\text{NiCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	—	—	0,025
$\text{TiO}_2\text{SO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$	—	—	0,100
$\text{BeSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$	—	—	0,050

Annexe IV : Techniques cytologiques

(Pour la préparation des colorants, voir annexe V).

Annexe IV A : Techniques histologiques

Déshydratation des tissus et inclusions :

- alcool 70° (directement après le fixateur): 1 journée
- alcool 90° : 1/2 journée
- alcool 95° : 1/2 journée
- alcool 100° : 1 nuit
- butanol 1 : 1 nuit au moins, 3 jours au plus (regonflement des cytoplasme)
- paraffine chaude : 1/2 journée
- inclusion dans les blocs (laisser sécher une journée au moins)

Coloration bleu alcian-safranine

- déparaffinage des lames:
 - 2. bains de xylène
 - 1. bain de xylène 1/2-alcool 100° 1/2
 - 2. bains d'alcool 100°
 - lavage à l'eau courante
- coloration et déshydratation:
 - bleu alcian 3 mn
 - rinçage à l'eau courante
 - safranine 2mn
 - 2 bains alcool 100° (directement)
 - 2 bains de xylène
 - montage au baume du Canada

Annexe IV B : Technique de comptage chromosomique par écrasement

Prétraitement: dans une solution aqueuse d' -mono-bromo-naphtalène à 1%;
solution à renouveler une fois par semaine et à agiter
avant utilisation; durée du traitement: 30 mn.

Fixation : dans l'alcool acétique; durée du traitement: 24 h au moins.

Coloration : dans le carmin chlorhydrique durant au moins 24 h.
(on peut laisser les racines plusieurs mois dans le colorant).

Montage : dans le carmin acétique.

RESUME.

Ce travail présente comment, une partie des techniques de culture in vitro, est susceptible d'être utilisée pour l'amélioration du bananier (Musa sp.).

Dans le cadre d'une multiplication végétative accélérée à partir d'apex végétatifs, les nouvelles plantes sont issues de la réorganisation des méristèmes caulinaires qui ont été coupés puis de leur fasciation et aussi de la néoformation directe de bourgeons sur la tige. Des pousses végétatives ont pu être aussi obtenues directement, à partir d'inflorescences.

Des cals, issus de tissus d'origine très différente (végétatifs et floraux) ont été initiés mais seuls, ceux provenant d'explants inflorescentiels ont montré une organogénèse caulinaire et permettent l'isolement de protoplastes.

Les observations morphologiques ont été couplées à des études cytologiques et les conséquences sur la conformité ou non de la technique de multiplication employée sont discutées.

MOTS CLES : Musa sp., multiplication conforme, culture de tissus, néoformation caulinaire, protoplastes, amélioration des plantes.